



**Nádia Isabel Valente Pedro**

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

## **Validação de Limpeza de Equipamentos para Produção de Fórmulas Líquidas e Pastosas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Dra. Ana Margarida Cepêda, Laboratórios  
Atral, SA

Co-orientador: Prof. Dr. Mário Eusébio, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Professora Dra. Ana Maria Martelo Ramos  
Arguente: Eng. Ricardo Jorge Milheiro Dias Tavares Grilo  
Vogal: Dra. Ana Margarida Vilares Cepêda



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro 2015**



**Nádia Isabel Valente Pedro**

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Validação de Limpeza de Equipamentos  
para a produção de Fórmulas Líquidas  
e Pastosas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Dra. Ana Margarida Cepêda, Laboratórios  
Atral, SA  
Co-orientador: Prof. Dr. Mário Eusébio, FCT-UNL

**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Faculdade de Ciências e Tecnologias

Departamento de Química

**Setembro 2015**



Esta dissertação está escrita sob as regras do novo acordo ortográfico.



*First, think. Second, believe.*

*Third, dream. And finally, dare.*

*- Walt Disney*





## **Validação de Limpeza de Equipamentos para Produção de Fórmulas Líquidas e Pastosas**

Copyright © Nádia Isabel Valente Pedro, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## Agradecimentos

A elaboração desta tese de mestrado não teria sido possível sem a parceria entre a FCT-UNL e os Laboratórios Atral, SA. Pela presença e apoio durante este estágio e também, no desenrolar do meu percurso académico, quero agradecer a algumas pessoas:

Ao Professor Mário Eusébio, que desde uma fase muito inicial teve a preocupação e cuidado de me aconselhar e ajudar a procurar um estágio que fosse ao encontro das minhas áreas de interesse. Pela disponibilidade constante para esclarecimento de dúvidas e pelo voto de confiança atribuído.

Ao Engenheiro Ricardo Grilo, pela oportunidade de estágio e preocupação em saber como estava a decorrer o trabalho.

À Dra. Ana Margarida Cepêda, pelos conhecimentos que me foi transmitindo ao longo dos últimos meses, pela paciência, ajuda e disponibilidade para me acompanhar neste percurso.

A uma Senhora a quem dizer um obrigada será sempre pouco, por toda a paciência, ajuda e preocupação. Por ter arranjado tempo onde dificilmente alguém conseguiria, por andar sempre escada cima-escada baixo para que eu não atrasasse o meu trabalho, agradeço do fundo do meu coração à D. Manuela Ferreira.

À Miusa Coelho, companheira de estágio e de gabinete, que aturou todos os meus momentos de parvoíce, pela boa disposição constante, por todas as conversas, conselhos e por manter um espírito sempre positivo, obrigada.

Um grande, gigante, definitivamente enorme obrigada à Ágata Melon pela paciência que teve comigo durante os últimos meses, e por me ter ajudado sempre que precisei de “salvamento” do HPLC. Principalmente por não ter estado apenas lá para resolver o problema, ter despendido tempo do seu trabalho para me ajudar compreender o funcionamento do equipamento sempre que tive alguma dúvida.

Como a implicância é muita e estas últimas semanas de estágio não seriam a mesma coisa, tenho que “desagradecer” ao David Santos, por não me deixar trabalhar, pelas parvoíces que tanta vez me fizeram ficar a pensar “oh meu deus...”, mas principalmente por conseguir fazer-me rir e aliviar um pouco o *stress* desta fase final. “Desobrigada” pelas nossas conversas idiotas.

Porque sem estas duas meninas esta experiência não tinha sido claramente a mesma, Bruna Pereira e Sofia Marques, colegas de faculdade e também colegas no Atral, obrigada por todo o apoio desde o momento da minha chegada ao Atral. Obrigada pela paciência, por toda a ajuda e por todos os momentos que partilhamos nestes últimos meses.

Aos restantes elementos da Garantia da Qualidade, Microbiologia e Controlo de Qualidade, que de formas distintas contribuíram para o desenvolvimento desta tese, obrigada pela vossa disponibilidade de tempo, ajuda e partilha de conhecimentos.

A uma pequena, grande futura Engenheira, Sara Pereira, obrigada por todos os momentos que partilhamos nos últimos anos, por tudo o que me ensinaste e por termos crescido juntas como todos os altos e baixos que foram surgindo neste nosso percurso. Obrigada pelo apoio, pela ajuda constante e por todas as coisas que me possa estar agora a esquecer e de certeza serão também tão importantes.

À Wendy Ribeiro e a Sofia Messias, por todos os nossos momentos de parvoíce, pela grande amizade, pela vossa presença durante todo este percurso e por serem únicas.

Pela sua estupidez natural, da qual eu claramente partilho, por me aturar em momentos que nem eu tenho paciência para me aturar, por todas as gargalhadas e aventuras que partilhámos, por seres um dos melhores amigos que alguma vez podia ter, mil obrigadas Rafael Costa.

À Lurdes Valente, pelo carinho, preocupação e pela força que me transmite. Por acreditar em mim quando eu não fui capaz de acreditar, por ter sido sempre um apoio e ser uma tia espetacular.

Por serem uma constante na minha vida, por todos os dias partilharem comigo momentos que certamente ficarão na memória. Pelo vosso esforço, dedicação e trabalho ao longo de todos estes anos para que pudesse ter esta e tantas outras oportunidades. Pelo apoio incondicional, carinho e extrema paciência, por serem vocês, um eterno obrigada aos meus pais.

## Resumo

A utilização de equipamentos multiproduto é uma prática bastante comum em indústria farmacêutica. No entanto, a esta prática podem associar-se riscos de transferência de contaminantes sendo de extrema importância garantir a eficácia dos procedimentos de limpeza estabelecidos.

Esta dissertação tem como objetivo a validação de limpeza dos equipamentos do setor das Formas Líquidas e Pastosas (FLP), dos Laboratórios Atral, SA por forma a evidenciar a eficácia e eficiência destes procedimentos na remoção de substâncias ativas (SA), excipientes e agentes de limpeza (tipos de contaminantes).

Tendo em conta a diversidade de produtos e equipamentos do setor, recorreu-se a uma análise de risco para identificação de equipamentos e produtos pior-caso. A partir desta análise será também possível identificar os resíduos de substância ativa a procurar após higienização de um determinado equipamento. Para tal, foi necessário estabelecer e validar métodos de análise em HPLC (High Performance Liquid Chromatography) capazes de identificar e quantificar os resíduos das SAs em questão.

A baixa frequência de produção de alguns dos produtos pior-caso impossibilitou o terminar dos estudos de validação de limpeza para o agitador de hélice e equipamentos de produção de cremes.

O desenvolvimento destes procedimentos permitirá identificar potenciais riscos anteriormente desconhecidos, bem como a recolha e elaboração de documentos comprovativos da capacidade e adequabilidade dos procedimentos de limpeza aplicados.

**Palavras-chave:** Validação de limpeza, FLP, HPLC, SA.



## Abstract

The use of multiproduct equipment is a common practice in the pharmaceutical industry. However, there is a possibility of contaminants transfer associated with this practice, an extremely important risk that has to be acknowledge in order to ensure cleaning procedures effectiveness.

The main focus of this work is to validate equipment cleaning procedures from a particular section of Atral Laboratories responsible for the manufacture of liquids, creams and ointments (FLP), proving the efficiency and effectiveness of these cleaning procedures removing active pharmaceutical ingredients (API), excipients and cleaning agents (types of contaminants).

Considering the diversity of products and equipment, a risk analysis was used for the identification of worst case products and equipment. With this analysis it will also be possible to identify which are the API residues to search for after sanitizing a certain equipment. To meet this end, it was necessary to stablish and validate different analysis methods in HPLC (High Performance Liquid Chromatography) capable of identifying and quantifying the API residues in question.

Due to a few worst case products low frequency production it wasn't possible to finish all cleaning validation studies

The development of this procedures will allow the identification of previously potentially unknown risks as well as gather the necessary information to create a document proving the suitability of the cleaning procedures used.

**Keywords:** Cleaning Validation, FLP, HPLC, API.





## Lista de Conteúdos

---

Lista de Figuras .....	IX
Lista de Tabelas .....	XI
Abreviaturas e Símbolos .....	XV
1 Introdução.....	1
1.1 Motivação e Enquadramento.....	1
1.2 Qualidade na Indústria Farmacêutica .....	1
1.2.1 Sistema de Qualidade Farmacêutica .....	1
1.2.2 Requisitos Legais de Qualidade Farmacêutica .....	4
1.3 Validação de Limpeza .....	5
1.4 Plano Mestre de Validação de Limpeza (PMVL).....	6
1.5 AtralCipan .....	6
2 Equipamentos e Procedimentos de Limpeza.....	9
2.1 Apresentação dos equipamentos do setor FLP .....	10
2.2 Descrição dos procedimentos de limpeza em caso de “Mudança de Produto” .....	10
3 Análise de Risco e Identificação de Piores-Casos.....	21
3.1 Seleção do Equipamento Pior-Caso .....	21
3.2 Seleção do Produto Pior-Caso .....	24
4 Identificação de Pontos Críticos.....	33
5 Limite Analítico, Metodologias de Amostragem e Métodos Analíticos.....	45
5.1 Metodologias de Amostragem.....	45
5.2 Determinação do Limite Analítico (LA).....	47
5.3 Métodos Analíticos .....	54
5.3.1 Parâmetros de Validação Analítica .....	55
5.3.2 Validação de Métodos Analíticos .....	58
6 Validação de Limpeza de Equipamentos .....	69
6.1 Inspeção Visual .....	69
6.2 Determinação de resíduos de Agentes de Limpeza .....	70
6.3 Determinação da Atividade Microbiana.....	74
6.4 Determinação de resíduos de Substância Ativa .....	77
7 Análise e Discussão de Resultados .....	81
7.1 Validação de Métodos Analíticos .....	81
7.1.1 Validação do Método de Quantificação de SA 7 .....	81
7.1.2 Validação do Método de Quantificação de SA 10.....	90
7.1.2.1 Teste de Solventes .....	90
7.1.2.1.1 Utilização de Etanol como solvente .....	91
7.1.2.1.2 Teste de Identificação de Solvente.....	95
7.1.2.2 Utilização de Acetonitrilo como Solvente .....	97
7.2 Resultados da Validação de Limpeza .....	109

7.2.1	Amostragem de controlo das Validades de Limpezas .....	121
8	Conclusões .....	123
9	Proposta para Trabalhos Futuros .....	125
10	Referências Bibliográficas .....	127
11	Apêndices .....	129

## Lista de Figuras

Figura 1.1 – Organograma do grupo AtralCipan. ....	7
Figura 1.2 – Estrutural organizacional dos Laboratórios Atral, SA. ....	7
Figura 2.1 - Esquema de organização dos equipamentos. ....	10
Figura 2.2 – Câmara de Pesagem do FLP. ....	11
Figura 2.3 – Reservatório de 250L (nº4). ....	11
Figura 2.4 – Reservatório de 100L (nº3). ....	12
Figura 2.5 – Reator de 2000L. ....	13
Figura 2.6 – Reator de 150L. ....	13
<i>Figura 2.7 – Agitador de hélice. ....</i>	<i>14</i>
Figura 2.8 – Agitador de duplo cone. ....	14
Figura 2.9 – Máquina de Enchimento de Líquidos (nº1). ....	15
Figura 2.10 – Homogeneizador. ....	16
Figura 2.11 – Máquina de Enchimento de Pomadas. ....	17
Figura 2.12 – Suporte de Filtração. ....	18
Figura 2.13 - Bomba de trasfega de líquidos (nº1). ....	18
Figura 2.14 - Mangueiras dedicadas de trasfega de líquidos. ....	19
Figura 4.1 - Identificação a branco da área de amostragem do reservatório de 250L (nº4) para determinação de resíduos da atividade microbiológica. ....	35
Figura 4.2 - Identificação a branco da área de amostragem do reator de 2000L para determinação de resíduos de SA e atividade microbiológica. ....	36
Figura 4.3 - Identificação da área de amostragem da máquina de enchimento de líquidos (nº1) para determinação de resíduos de SA e atividade microbiológica. ....	38
Figura 4.4 - Identificação a branco da área de amostragem das mangueiras dedicadas da bomba de trasfega de líquidos para determinação da atividade microbiológica. ....	43
Figura 5.1 – Representação do método de amostragem com o swab. ....	62
Figura 6.1 – Frasco para amostragem TOC. ....	71
Figura 6.2 – Zaragatoa. ....	75
Figura 6.3 – Placa de contato. ....	76
Figura 6.4 – Frasco estéril para recolha de águas. ....	76
Figura 7.1 - Curva de calibração para a validação do método analítico - SA 7. ....	82
Figura 7.2 - Cromatograma correspondente à solução padrão a 50% do limite analítico (LA 50%) – SA 7. ....	84
Figura 7.3 - Cromatograma correspondente à solução padrão ao limite analítico (LA) – SA 7. ....	85
Figura 7.4 – Cromatograma correspondente à solução padrão a 200% do limite analítico (LA 200%) – SA 7. ....	85
Figura 7.5 – Cromatograma correspondente ao solvente de preparação de amostras – SA 7. ....	85
Figura 7.6 – Cromatograma correspondente ao branco de swab – SA 7. ....	86
Figura 7.7 - Cromatograma correspondente ao branco de recuperação da placa – SA 7. ....	86
Figura 7.8 – Branco de recuperação da placa de detergente – SA 7. ....	86
Figura 7.9 – Cromatograma correspondente à solução de detergente a 10ppm – SA 7. ....	87
Figura 7.10 - Cromatograma correspondente à solução de detergente a 10ppm contendo o analito ao nível de concentração de LA 50% - SA 7. ....	87
Figura 7.11 – Cromatograma correspondente à amostra de recuperação de swab – SA 7. ....	87
Figura 7.12 – Cromatograma correspondente à amostra de recuperação da placa – SA 7. ....	88
Figura 7.13 – Curva de calibração para a validação do método analítico (utilizando etanol como solvente) - SA 10. ....	91
Figura 7.14 - Curva de calibração para a validação do método analítico (utilizando acetonitrilo como solvente) - SA 10. ....	98
Figura 7.15 - Cromatograma correspondente à solução padrão a 50% do limite analítico (LA 50%) – SA 10. ....	100
Figura 7.16 - Cromatograma correspondente à solução padrão ao limite analítico (LA) – SA 10. ....	101
Figura 7.17 - Cromatograma correspondente à solução padrão a 200% do limite analítico (LA 200%) – SA 10. ....	101

Figura 7.18 – Cromatograma correspondente ao solvente de preparação de amostras – SA 10. ....	101
Figura 7.19 – Cromatograma correspondente ao branco de swab – SA 10.....	102
Figura 7.20 – Cromatograma correspondente ao branco de recuperação da placa com swab – SA 10. .....	102
Figura 7.21 – Cromatograma correspondente ao branco de recuperação de placa com solvente - SA 10.....	102
Figura 7.22 – Cromatograma correspondente ao branco de recuperação da placa de detergente com swab – SA 10. ....	103
Figura 7.23 – Cromatograma correspondente ao branco de recuperação da placa de detergente com solvente – SA 10. ....	103
Figura 7.24 – Cromatograma correspondente à solução de detergente a 10ppm – SA 10. ....	103
Figura 7.25 – Cromatograma correspondente à solução de detergente a 10ppm contendo o analito ao nível de LA 50% - SA 10. ....	104
Figura 7.26 – Cromatograma correspondente à amostra de recuperação do swab – SA10. ....	104
Figura 7.27 – Cromatograma correspondente à amostra de recuperação da placa com swab – SA 10. .....	104
Figura 7.28 - Cromatograma correspondente à amostra de recuperação da placa com solvente – SA 10.....	105

## Lista de Tabelas

Tabela 2.1 – Parâmetros a considerar no desenvolvimento dos procedimentos de limpeza.....	9
Tabela 3.1 – Índices de risco para a especificidade do equipamento. ....	22
Tabela 3.2 – Índices de risco para o grau de utilização do equipamento. ....	22
Tabela 3.3 – Índices de risco para a quantidade de produtos diferentes produzidos por equipamento. ....	22
Tabela 3.4 – Identificação de agrupamento de equipamentos e de equipamentos com ITL única.....	22
Tabela 3.5 - Análise de risco para o agrupamento de reservatórios de 250L e 350L. ....	23
Tabela 3.6 - Análise de risco para o agrupamento de reservatórios de 100L. ....	23
Tabela 3.7 – Análise de risco para o agrupamento de reatores. ....	24
Tabela 3.8 - Análise de risco para o agrupamento de agitadores. ....	24
Tabela 3.9 - Análise de risco para o agrupamento de Máquinas de Enchimento de Líquidos.....	24
Tabela 3.10 – Índices de risco de concentração de substância ativa no produto. ....	25
Tabela 3.11 – Índices de risco de solubilidade em água da substância ativa do produto.....	25
Tabela 3.12 – Índices de risco de frequência de produção do produto (nº lotes/ano).....	26
Tabela 3.13 – Índices de risco de toxicidade do produto.....	26
Tabela 3.14 – Índices de risco de dificuldade de remoção do produto.....	26
Tabela 3.15 – Análise de risco para os produtos a passar pela câmara de pesagem. ....	27
Tabela 3.16 - Análise de risco para os produtos a passar pelo reservatório de 250L (nº4). ....	28
Tabela 3.17 - Análise de risco para os produtos a passar pelo reservatório de 100L (nº3). ....	29
Tabela 3.18 – Solubilidade de SA em água para os produtos em estudo.....	29
Tabela 3.19 - Análise de risco para os produtos a passar pelo reator de 2000L. ....	30
Tabela 3.20 – Posologia diária dos produtos a passar no reator de 2000L. ....	30
Tabela 3.21 - Análise de risco para os produtos a passar pelo agitador de hélice. ....	31
Tabela 3.22 - Análise de risco para os produtos a passar pela máquina de enchimento de líquidos (nº1). ....	31
Tabela 3.23 - Análise de risco para os produtos a passar pelo homogeneizador e máquina de enchimento de pomadas. ....	32
Tabela 3.24 – Resumo dos produtos pior-caso por equipamento. ....	32
Tabela 4.1 – Pontos críticos de amostragem da câmara de pesagem para determinação de resíduos de SA (marcação branca a cheio e tracejado, amostra A e B, respetivamente) e atividade microbiológica (marcação a preto). ....	33
Tabela 4.2 – Pontos críticos de amostragem do reservatório de 250L (nº4) para determinação de resíduos de SA (marcação branca a cheio e tracejado, amostra A e B, respetivamente). ....	34
Tabela 4.3 - Pontos críticos de amostragem do reservatório de 100L (nº3) para determinação de resíduos de SA (marcação branca a cheio e tracejado, amostra A e B, respetivamente) e atividade microbiológica (marcação a preto). ....	35
Tabela 4.4 - Pontos críticos de amostragem do reator de 150L para determinação de resíduos da atividade microbiológica. ....	36
Tabela 4.5 - Pontos críticos de amostragem do agitador de hélice para determinação de resíduos de SA (marcação branca a cheio e tracejado, amostra A e B, respetivamente) e atividade microbiológica (marcação a preto). ....	37
Tabela 4.6 - Pontos críticos de amostragem do agitador de duplo cone para determinação da atividade microbiológica. ....	37
Tabela 4.7 - Pontos críticos de amostragem do Homogeneizador para determinação da e atividade microbiológica (marcação a preto). ....	39
Tabela 4.8 - Pontos críticos de amostragem do Homogeneizador para determinação de resíduos de SA (marcação branca a cheio e tracejado, amostra A e B, respetivamente). ....	40
Tabela 4.9 - Pontos críticos de amostragem da Máquina de Enchimento de Pomadas para determinação da atividade microbiológica (marcação a preto).....	41
Tabela 4.10 - Pontos críticos de amostragem a Máquina de Enchimento de Pomadas para determinação de resíduos de SA (marcação branca a cheio e tracejado, amostra A e B, respetivamente).....	42

Tabela 5.1 – Metodologia de recolha de amostras para resíduo de SA a aplicar em cada equipamento.....	47
Tabela 5.2 – Fatores de segurança para diversas formas farmacêuticas.....	48
Tabela 5.3 – Determinação do limite residual de superfície.....	52
Tabela 5.4 – Determinação do limite analítico - Amostragem com Swab.....	52
Tabela 5.5 – Determinação do limite analítico - Amostragem com Solvente.....	53
Tabela 5.6 – Limites analíticos selecionados por agrupamento de SA.....	53
Tabela 5.7 – Métodos analíticos específicos e não-específicos.....	54
Tabela 5.8 – Materiais, reagentes e equipamentos utilizados no procedimento de validação.....	58
Tabela 5.9 – Condições de trabalho em HPLC.....	59
Tabela 5.10 – Diluições para preparação de soluções padrão (produto 11).....	59
Tabela 5.11 – Diluições para preparação de soluções padrão (produto 13).....	60
Tabela 5.12 – Solventes utilizados na preparação de soluções e procedimentos de recolha de amostras.....	61
Tabela 5.13 – Resumo dos parâmetros em análise relativos a cada método analítico testados na validação.....	67
Tabela 6.1 - Identificação de materiais e equipamentos utilizados na recolha e análise de amostras para determinação de resíduos de agentes de limpeza.....	70
Tabela 6.2 - Determinação do Limite Residual de Superfície para Agentes de Limpeza.....	73
Tabela 6.3 - Determinação do Limite Analítico para Agentes de Limpeza.....	73
Tabela 6.4 – Limite Aceitável para resíduos Agentes de Limpeza.....	74
Tabela 6.5 - Identificação de materiais e equipamentos utilizados na recolha e análise de amostras para procura de atividade microbiológica.....	75
Tabela 6.6 – Limites para a contaminação microbiana (UFC's/placa).....	77
Tabela 6.7 – Identificação de materiais e equipamentos utilizados na recolha e análise de amostras para procura de resíduos SA.....	78
Tabela 6.8 – Procedimentos de análise de amostras de resíduos de SA.....	79
Tabela 6.9 – Critérios de aceitação relativos à presença de resíduos de SA.....	80
Tabela 7.1 - Dados relativos à linearidade obtidos para a validação do método analítico - SA 7.....	81
Tabela 7.2 – Limite de quantificação e limite de deteção – SA 7.....	82
Tabela 7.3 – Confirmação do limite de quantificação – SA 7.....	83
Tabela 7.4 – Análise da precisão do sistema – SA 7.....	83
Tabela 7.5 - Análise da repetibilidade – SA 7.....	84
Tabela 7.6 – Análise de resultados relativos à recuperação do swab para solvente – SA 7.....	89
Tabela 7.7 - Análise de resultados relativos à recuperação do método de amostragem – SA 7.....	89
Tabela 7.8 – Estabilidade das soluções analíticas à temperatura ambiente com exposição à luz – SA 7.....	90
Tabela 7.9 - Estabilidade das soluções analíticas à temperatura de 5±3°C ao abrigo da luz – SA 7.....	90
Tabela 7.10 – Estabilidade da substância no equipamento – SA 7.....	90
Tabela 7.11 – Dados relativos à linearidade obtidos para a validação do método analítico (utilizando etanol como solvente) - SA 10.....	91
Tabela 7.12 – Limite de quantificação e limite de deteção (utilizando o etanol como solvente) – SA 10.....	92
Tabela 7.13 – Confirmação do limite de quantificação (utilizando etanol como solvente) – SA 10.....	92
Tabela 7.14 – Análise da precisão do sistema (utilizando o etanol como solvente) – SA 10.....	93
Tabela 7.15 – Análise da repetibilidade (utilizando etanol como solvente) – SA 10.....	93
Tabela 7.16 – Análise de resultados relativos à recuperação do swab para solvente (utilizando etanol como solvente) – SA 10.....	94
Tabela 7.17 – Análise de resultados relativos à recuperação do método de amostragem (utilizando etanol como solvente) – SA 10.....	94
Tabela 7.18 - Análise de resultados relativos à recuperação da placa para solvente (utilizando etanol como solvente) – SA 10.....	95
Tabela 7.19 – Análise da recuperação do método de amostragem utilizando a combinação de solventes metanol-etanol.....	96
Tabela 7.20 - Análise da recuperação do método de amostragem utilizando metanol como solvente.....	96

Tabela 7.21 - Análise da recuperação do método de amostragem utilizando etanol como solvente. .	96
Tabela 7.22 - Análise da recuperação do método de amostragem utilizando fase móvel como solvente. ....	96
Tabela 7.23 - Análise da recuperação do método de amostragem utilizando acetona como solvente. ....	96
Tabela 7.24 - Análise da recuperação do método de amostragem utilizando acetonitrilo como solvente. ....	97
Tabela 7.25 – Dados relativos à linearidade obtidos para a validação do método analítico (utilizando acetonitrilo como solvente) - SA 10.....	97
Tabela 7.26 – Limite de quantificação e limite de detecção (utilizando acetonitrilo como solvente) – SA 10.....	98
Tabela 7.27 – Confirmação do limite de quantificação (utilizando acetonitrilo como solvente) - SA 10. ....	99
Tabela 7.28 – Análise da precisão do sistema (utilizando acetonitrilo como solvente) – SA 10. ....	99
Tabela 7.29 – Análise da repetibilidade (utilizando acetonitrilo como solvente) – SA 10.....	100
Tabela 7.30 – Análise de resultados relativos à recuperação do swab para solvente – SA 10. ....	106
Tabela 7.31 - Análise de resultados relativos à recuperação do método de amostragem – SA 10. ...	106
Tabela 7.32 - Análise de resultados relativos à recuperação da placa para solvente – SA 10.....	107
Tabela 7.33 – Estabilidade das soluções analíticas à temperatura ambiente com exposição à luz – SA 10.....	108
Tabela 7.34 - Estabilidade das soluções analíticas à temperatura de $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ao abrigo da luz – SA 10. ....	108
Tabela 7.35 – Estabilidade da substância no equipamento – SA 10.....	108
Tabela 7.36 - Informações do processo de amostragem para a validação da Câmara de Pesagem.....	109
Tabela 7.37 – Resultados de validação da Câmara de Pesagem.....	109
Tabela 7.38 - Informações do processo de amostragem para a validação do Reservatório de 250L (nº4). ....	110
Tabela 7.39 - Resultados de validação do Reservatório de 250L (nº4). ....	111
Tabela 7.40 - Informações do processo de amostragem para a validação do Reservatório de 100L (nº3). ....	111
Tabela 7.41 - Resultados de validação do Reservatório de 100L (nº3). ....	112
Tabela 7.42 - Informações do processo de amostragem para a validação do Reator de 2000L. ....	113
Tabela 7.43 - Resultados de validação do Reator de 2000L. ....	113
Tabela 7.44 - Informações do processo de amostragem para a validação do Reator de 150L. ....	114
Tabela 7.45 - Resultados de validação do Reator de 150L. ....	114
Tabela 7.46 - Informações do processo de amostragem para validação do Agitador de Hélice. ....	115
Tabela 7.47 - Resultados de validação do Agitador de Hélice. ....	115
Tabela 7.48 - Informações do processo de amostragem para a validação do Agitador de Duplo Cone. ....	116
Tabela 7.49 - Resultados de validação do Agitador de Duplo Cone. ....	116
Tabela 7.50 - Informações do processo de amostragem para a validação da Máquina de Enchimento de Líquidos (nº1). ....	117
Tabela 7.51 - Resultados de validação da Máquina de Enchimento de Líquidos (nº1). ....	117
Tabela 7.52 – Informações do processo de amostragem para a validação da Bomba de Trasfega de Líquidos (nº1). ....	118
Tabela 7.53 - Resultados de validação da Bomba de Trasfega de Líquidos (nº1).....	118
Tabela 7.54 - Informações do processo de amostragem para a validação do Homogeneizador. ....	119
Tabela 7.55 - Resultados de validação do Homogeneizador. ....	119
Tabela 7.56 - Informações do processo de amostragem para validação da Máquina de Enchimento de Pomadas.....	120
Tabela 7.57 - Resultados de validação da Máquina de Enchimento de Pomadas.....	120
Tabela 7.58 – Determinação da Validade dos Procedimentos de Limpezas. ....	121
Tabela 11.1– Produtos a passar pela câmara de pesagem. ....	129
Tabela 11.2 – Produtos a passar pela máquina de enchimento de líquidos (nº1). ....	130
Tabela 11.3 – Produtos a passar pela máquina de enchimento de líquidos (nº2). ....	130
Tabela 11.4 – Produtos a passar pelo agitador de hélice.....	130

Tabela 11.5 – Produtos a passar pelo agitador de duplo cone.....	130
Tabela 11.6 – Produtos a passar pelo homogeneizador. ....	131
Tabela 11.7 – Produtos a passar pela máquina de enchimento de pomadas.....	131
Tabela 11.8 – Produtos a passar pelas bombas de trasfega e suporte de filtração.....	131
Tabela 11.9 – Produtos a passar pelo reator de 2000 litros. ....	132
Tabela 11.10 – Produtos a passar pelo reator de 1000 litros. ....	132
Tabela 11.11 – Produtos a passar pelo reator de 150 litros. ....	132
Tabela 11.12 – Produtos a passar pelo reservatório de 350 litros (nº1) e (nº2).....	133
Tabela 11.13 – Produtos a passar pelo reservatório de 250 litros (nº1).....	133
Tabela 11.14 – Produtos a passar pelo reservatório de 250 litros (nº2), (nº3) e (nº5). ....	134
Tabela 11.15 - Produtos a passar pelo reservatório de 250 litros (nº4).....	134
Tabela 11.16 - Produtos a passar pelo reservatório de 100 litros (nº1).....	135
Tabela 11.17 - Produtos a passar pelo reservatório de 100 litros (nº2).....	135
Tabela 11.18 - Produtos a passar pelo reservatório de 100 litros (nº3).....	136



## Abreviaturas e Símbolos

---

<b>Aa</b>	Área do pico correspondente à substância ativa no cromatograma da solução amostra [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ]
<b>ADI</b>	Acceptable Daily Intake
<b>AIM</b>	Autorização de Introdução no Mercado
<b>Ap</b>	Área média do pico correspondente à substância ativa no cromatograma da solução padrão [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ]
<b>API</b>	Active Pharmaceutical Ingredient
<b>ASA</b>	Área de Superfície Amostrada [ $\text{cm}^2$ ]
<b>ASL</b>	Área de Superfície de Lavada [ $\text{cm}^2$ ]
<b>C</b>	Conforme
<b>CV</b>	Coeficiente de Variação
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>DFA</b>	Diluyente Fluido A
<b>DGAV</b>	Direção Geral de Alimentação e Veterinária
<b>ELISA</b>	Enzyme Immunosorbant Assay
<b>EMA</b>	European Medicines Agency
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FLP</b>	Formas Líquidas e Pastosas
<b>FMEA</b>	Failure Mode Effects Analysis
<b>FMECA</b>	Failure Mode Effects and Criticality Analysis
<b>FR</b>	Fator de Recuperação
<b>FS</b>	Fator de Segurança
<b>FSO</b>	Formas Sólidas Orais
<b>FTA</b>	Fault Tree Analysis
<b>GMP</b>	Good Manufacturing Practice
<b>GQ</b>	Garantia da Qualida

<b>HACCP</b>	Hazard Analysis and Critical Control Points
<b>HAZOP</b>	Hazard Operability Analysis
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>INFARMED</b>	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P.
<b>INJ</b>	Injetável
<b>I.R.</b>	Índice de Risco
<b>ITL</b>	Instrução Técnica de Limpeza
<b>LA</b>	Limite Analítico [ $\mu\text{g/mL}$ ]
<b>LD</b>	Limite de Detecção [ $\mu\text{g/mL}$ ]
<b>LD<sub>50</sub></b>	Dose Letal
<b>LQ</b>	Limite de Quantificação [ $\mu\text{g/mL}$ ]
<b>LRA</b>	Limite de Resíduo Aceitável [ $\mu\text{g/g}$ ]
<b>LRS</b>	Limite Residual de Superfície [ $\mu\text{g/cm}^2$ ]
<b>mDd</b>	Mínima Dose Diária [mg ou $\mu\text{g}$ ]
<b>MDd</b>	Máxima Dose Diária [g]
<b>MIR</b>	Mid Infrared Spectrophotometry
<b>NA</b>	Não Aplicável
<b>ND</b>	Não Detetável
<b>NIR</b>	Near Infrared Spectrophotometry
<b>NOEL</b>	No Observable Effect Level
<b>P</b>	Atividade do Padrão
<b>ppb</b>	Parte por bilhão
<b>ppm</b>	Parte por milhão
<b>PMVL</b>	Plano Mestre de Validação
<b>SA</b>	Substância Ativa
<b>SCEP</b>	Superfície de contato do equipamento com o produto [ $\text{cm}^2$ ]
<b>T</b>	Teor de substância ativa [ $\mu\text{g/mL}$ ]
<b>TL</b>	Tamanho do Lote [Kg ou g]

<b>TOC</b>	Total Organic Carbon
<b>TP</b>	Toma de ensaio padrão [mg]
<b>TSA</b>	Tryptic Soy Agar
<b>UC</b>	Unidade Celasporínica
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colónias
<b>UP</b>	Unidade Penicilínica
<b>VL</b>	Volume de Lavagem [mL]
<b>Vp</b>	Volume total de diluição do padrão [mL]
<b>VS</b>	Volume de Solvente [mL]



# 1 Introdução

---

## 1.1 Motivação e Enquadramento

A utilização de equipamentos multiproduto é uma prática bastante comum em indústria farmacêutica. No entanto, a esta prática podem associar-se riscos de transferência de contaminantes sendo de extrema importância garantir a eficácia dos procedimentos de limpeza estabelecidos.

Nesta dissertação de mestrado pretende-se desenvolver procedimentos de validação de limpeza, por forma a comprovar e estabelecer uma prova documental relativa a eficácia dos diversos procedimentos de limpeza em vigor na secção das Formas Líquidas e Pastosas.

Recorreu-se a uma análise de risco para identificar os equipamentos a incluir nos estudos de validação, bem como a identificação do produto pior-caso A, produto de maior risco associado caso se verifique a possibilidade de contaminação cruzada.

Além de comprovar a eficácia dos procedimentos de limpeza efetuados, o desenvolvimento de estudos de validação permitem ainda a identificação de potenciais problemas anteriormente desconhecidos, bem como a implementação de medidas corretivas por forma a garantir a qualidade dos produtos em produção num determinado equipamento.

## 1.2 Qualidade na Indústria Farmacêutica

A qualidade é uma preocupação premente na indústria farmacêutica, sendo de extrema importância cumprir e manter padrões de segurança e eficácia durante as fases de desenvolvimento, produção, distribuição e venda de medicamentos. Existindo diversos intervenientes durante o ciclo de vida de um medicamento, a responsabilidade de preservação das suas características é partilhada. Sendo o mercado Europeu reconhecido pelos seus elevados padrões de qualidade, cabe às indústrias farmacêuticas inseridas no mesmo ou com intuito de venda para este mercado, garantir que os medicamentos por si produzidos se encontram de acordo com os requisitos exigidos para a sua introdução no mercado [1].

Por forma a cumprir tais requisitos, as indústrias farmacêuticas têm vindo a implementar Sistemas de Qualidade Farmacêutica incorporando Boas Práticas de Fabrico (GMP) e Gestão de Riscos de Qualidade.

### 1.2.1 Sistema de Qualidade Farmacêutica

O sistema de qualidade farmacêutica é um conjunto de medidas cuja aplicação pretende assegurar o controlo de todos os pontos possíveis de influenciar a qualidade de um medicamento. Algumas dessas medidas consistem:

- No melhoramento continuado do processo de produção através do *design*, planeamento, implementação e manutenção deste sistema por forma a obter-se resultados consistentes e com atributos de qualidade apropriados.

- No *design* e desenvolvimento de medicamentos, bem como a sua posterior produção e controlo de qualidade tendo em conta os requisitos das boas práticas de fabrico;

- Na libertação do produto após certificação do lote, por forma a garantir que os requisitos de autorização de comercialização e produção foram cumpridos.

- Em avaliar, se após implementação de qualquer alteração, os parâmetros de qualidade do produto são alcançados ou houve impacto não intencional na qualidade do produto;

- Na utilização de sistemas de monitorização e de controlo eficazes para o desempenho do processo e qualidade do produto por forma a estabelecer-se um estado de controlo;

- Em garantir, dentro do possível, que os medicamentos são armazenados, distribuídos e manuseados com os cuidados necessários por forma a manter-se a qualidade do produto anteriormente à venda ao doente.

Assim, o sistema de qualidade deve ser planeado em concordância com a complexidade e dimensão da atividade da empresa, sendo apresentado sobre forma documental. É importante que este documento apresente os princípios de gestão de riscos, bem como a descrição do sistema de controlo de qualidade. Por forma a identificar oportunidades de melhoramento contínuo de medicamentos, processo e do próprio sistema de qualidade, deve ser feita uma revisão periódica do sistema de qualidade farmacêutica em vigor [2].

### **Boas Práticas de Fabrico (GMP)**

As GMPs asseguram a produção consistente e controlada de produtos de acordo com padrões de qualidade adequados para a sua introdução no mercado [2,3].

A aplicação de GMPs deve ser efetuada tanto nos processos de produção como no controlo de qualidade dos produtos. A limpeza de equipamentos é considerada um elemento crítico na garantia de qualidade de um produto, sendo os estudos de validação de limpeza um dos constituintes fundamentais das GMPs [2,3].

Alguns dos requisitos básicos associados à aplicação de GMPs podem ser consultados em seguida [2]:

- Todos os processos de fabrico devem estar claramente definidos possibilitando a produção sistemática e capaz de produtos de qualidade de acordo com as especificações;

- Todos os passos críticos ou alterações significativas que sejam efetuadas ao processo devem ser validadas;

- Devem ser garantidas todas as condições necessárias para aplicação das GMPs, incluindo:

- Pessoal devidamente treinado e qualificado;
  - Instalações, equipamento e serviços adequados;
  - Materiais, recipientes e rótulos adequados;
  - Procedimentos e instruções técnicas aprovadas em concordância com o sistema de qualidade farmacêutica;
  - Armazenamento e transporte adequados.
- Todos os procedimentos e instruções técnicas devem ser escritos de forma clara e inequívoca;
  - Caso se verifiquem quaisquer desvios, deve ser efetuado um registo dos mesmos e iniciada uma investigação de modo a identificar a sua causa e aplicar ações de correção e prevenção;
  - Devem ser analisadas todas as reclamações sobre os produtos, por forma a identificar a causa do defeito e prevenir nova ocorrência.

### **Gestão de Riscos de Qualidade**

A gestão de riscos é um meio proactivo para identificação e controlo de possíveis problemas durante os processos de desenvolvimento e produção, garantido a qualidade e eficácia dos produtos. A análise de riscos deve apresentar uma abordagem científica e apresentar um nível de esforço, formalidade e documentação para a mesma proporcional ao nível de risco identificado [4].

As indústrias farmacêuticas e entidades reguladoras recorrem a alguns dos seguintes métodos de análise para avaliação e gestão de riscos [4]:

- Análise dos Modos de Falha e os seus Efeitos (FMEA);
- Análise da Criticidade dos Modos de Falha e seus Efeitos (FMECA);
- Análise da Árvore de Falhas (FTA);
- Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (HACCP);
- Análise de Perigos Operacionais (HAZOP);
- Análise Preliminar de Perigos (PHA).

A avaliação e gestão de riscos será efetuada por aplicação da análise de perigos e controlo de pontos críticos (HACCP). Esta análise consistirá em várias etapas desde a análise de perigo e identificação de medidas preventivas para cada etapa do processo, identificação dos pontos críticos de controlo, determinação de limites de controlo até ao desenvolvimento de sistemas de monitorização e manutenção de registos. Permitindo a identificação e gestão de riscos associados a perigos físicos, químicos e biológicos, facilitando a monitorização de pontos críticos durante a produção como também em outras fases do ciclo de vida de um produto [4].

## **Controlo de Qualidade**

O controlo de qualidade é parte integrante das GMPs, responsável pelas amostragens, especificações, ensaios, organização de documentação e libertação de materiais para utilização ou produtos para venda após comprovação de qualidade satisfatória [2].

Alguns dos requisitos básicos do controlo de qualidade são:

- Adequabilidade das instalações, pessoal treinado e procedimentos de amostragem e teste aprovados para análise de matérias-primas, materiais de embalagem, produtos acabados e monitorização de condições ambientais;
- Validação de métodos de ensaio;
- Registo de todos os procedimentos de inspeção, amostragem e análise realizado, tendo também o cuidado de registar quaisquer desvios verificados;
- A libertação de um determinado lote para venda requer a certificação por uma pessoa qualificada, garantindo o cumprimento de todos os requisitos de qualidade;
- Manter amostras em quantidade suficiente de matérias-primas e amostras de referência, para análises futuras.

### **1.2.2 Requisitos Legais de Qualidade Farmacêutica**

Sempre que se pretenda introduzir um novo medicamento no mercado, é necessário o pedido de Autorização de Introdução no Mercado (AIM) a uma entidade reguladora da atividade farmacêutica. A nível Nacional as entidades reguladoras da atividade farmacêutica para medicamentos de uso humano e veterinário são a Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. (INFARMED) e a Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), respetivamente [5,6].

Indústrias pertencentes à Comunidade Europeia ou que pretendam comercializar os seus produtos no espaço Europeu, necessitam da aprovação da European Medicines Agency (EMA). De forma semelhante, a aprovação do comércio de medicamentos nos Estados Unidos da América será efetuado pela Food and Drug Administration (FDA) [7,8].

Cabe às entidades reguladoras efetuar inspeções periódicas às instalações industriais por forma a assegurar a produção de medicamentos de acordo com as Boas Práticas de Fabrico, verificação de AIM's e garantir a qualidade dos medicamentos para a finalidade a que se destinam.



### 1.3 Validação de Limpeza

A utilização de equipamentos multiproduto é uma prática bastante comum em indústria farmacêutica. No entanto, a esta prática podem associar-se riscos de transferência de contaminantes sendo de extrema importância garantir a eficácia dos procedimentos de limpeza estabelecidos [9].

Quer seja por solicitação de um cliente, entidades reguladoras ou apenas para controlo interno da empresa, deve existir um documento que comprove a eficácia e consistência dos diversos procedimentos de limpeza em vigor sendo este designado por protocolo/relatório de validação de limpeza [10].

O desenvolvimento de estudos de validação de limpeza permite a identificação de potenciais problemas anteriormente desconhecidos, possibilitando a implementação de medidas corretivas por forma a garantir a eficácia dos medicamentos produzidos [9,11].

Para que possa ser desenvolvido um processo de validação consistente e adequado a cada equipamento, é necessário identificar os tipos de contaminações que se pode esperar encontrar num medicamento após a ocorrência de um procedimento de limpeza inadequado. A contaminação cruzada é originada por contaminação de um lote com resíduos de substância ativa (SA) ou excipientes do lote anteriormente produzido. Um outro tipo de contaminação, normalmente referida como contaminação com materiais ou compostos não intencionais, está associada ao decorrer de trabalhos de manutenção, limpeza ou mesmo de utilização do equipamento, podendo encontrar-se vestígios de lubrificantes, agentes e materiais de limpeza ou pedaços de equipamento. Não só por limpeza mas também por condições de armazenamento inadequadas, como presença de humidade ou por falta de isolamento, podem ser encontrados vestígios de contaminação microbiológica [10,11].

A validação de limpeza é considerada completa após a recolha e análise de amostras provenientes 3 lotes diferentes do mesmo produto [12].

Em suma, o protocolo/relatório de validação de limpeza deve conter as seguintes informações [12]:

- Explicação clara e sucinta do objetivo e razão do processo de validação;
- Identificação dos membros responsáveis pela realização e aprovação da validação;
- Descrição do equipamento envolvido;
- Descrição do procedimento de limpeza aplicado, estabelecimento dos intervalos entre o fim da produção e o início do procedimento de limpeza;
- Referenciar o protocolo e o relatório de validação do método analítico a utilizar para análise de amostras;
- Inspeção visual (objetivo, materiais utilizados, descrição do procedimento e resultados);
- Análises Microbiana e Química (SA e agentes de limpeza) devem especificar:
  - Plano de amostragem (identificação de pontos críticos, materiais necessários e métodos de amostragem);
  - Cálculos para estabelecer os critérios de aceitação;

- Resultados das análises;
- Avaliação do intervalo de tempo durante o qual o estado de limpeza do equipamento se mantém adequado;
- Periodicidade e monitorização do estudo de validação.

A revalidação de um procedimento de limpeza deve ser periódica, com intervalos de tempo definidos. No entanto, sempre que se verifiquem alterações na composição de um medicamento, procedimento de limpeza, equipamento, processo de produção ou a passagem de um novo produto pelo equipamento, é necessária a revalidação do procedimento de limpeza [13].

#### **1.4 Plano Mestre de Validação de Limpeza (PMVL)**

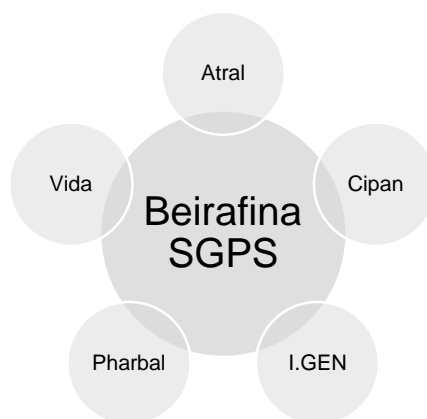
Por forma a garantir e assegurar que todos os produtos se apresentam livres de contaminações e com elevada qualidade, é estabelecido um plano que descreve a estratégia da empresa por forma a assegurar a efetividade e segurança dos procedimentos de limpeza. Este documento deve ser utilizado como meio de coordenação das atividades de validação e referenciar as seguintes informações [12,14]:

- Políticas e estratégias de validação;
- Estrutura organizacional, incluindo documentos e responsabilidades nas atividades de validação;
- Descrição das instalações, equipamentos, sistemas e estado dos procedimentos de validação;
- Guia de apoio para estabelecer critérios de aceitação;
- Referência a trabalhos/documentos já desenvolvidos.

#### **1.5 AtralCipan**

O grupo AtralCipan integra duas unidades fabris, o Atral responsável pela produção de especialidades farmacêuticas e a Cipan produtora de matérias-primas (API – Active Pharmaceutical Ingredient). O grupo teve início numa farmácia de bairro, a Atral, em Alcântara. Num período pós-guerra, o mercado farmacêutico apresenta oportunidades inexploradas, e a necessidade de matérias-primas levou ao desenvolvimento do projecto produção de antibióticos – Cipan [15].

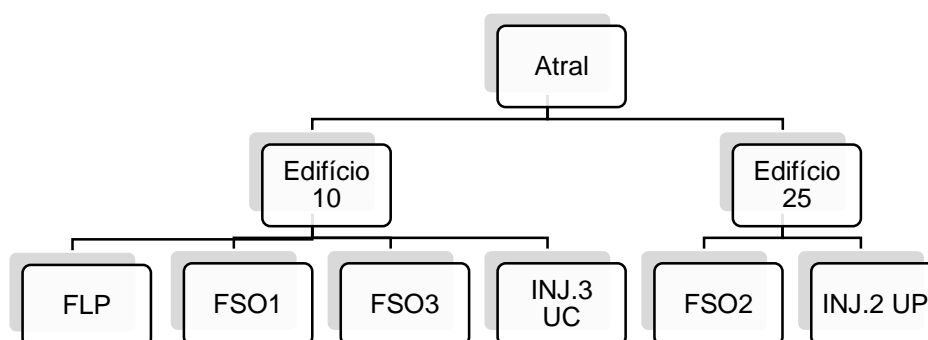
Atualmente, o AtralCipan SGPS lidera as empresas do setor químico-farmacêutico pertencentes à holding geral Beirafina SGPS (figura 1.1).



**Figura 1.1 – Organograma do grupo AtralCipan.**

Uma das razões do sucesso do grupo AtralCipan advém da sua capacidade de satisfazer clientes e parceiros exigentes, bem como utentes, profissionais de saúde e indústria farmacêutica que procuram e valorizam a conformidade com as Boas Práticas de Fabrico [16].

Os laboratórios Atral, SA são constituídos por dois edifícios, edifício 10 e edifício 25. Na figura 1.2 apresenta-se a estrutura organizacional dos sectores de produção em cada um dos edifícios.



**Figura 1.2 – Estrutura organizacional dos Laboratórios Atral, SA.**

Como pode ser observado na figura 1.2, o edifício 10 é constituído por quatro sectores de produção sendo estes:

- Formas Líquidas e Pastosas (FLP), responsável pela produção de cremes e pomadas, xaropes, loções capilares, sprays nasais e soluções orais;
- Formas Sólidas Oraís Gerais (FSO1), responsável pela produção de saquetas, comprimidos, cápsulas e implantes;
- Formas Sólidas Oraís Cefalosporínicas (FSO3), responsável pela produção de comprimidos, capsulas, saquetas e suspensões cefalosporínicas;

- Unidade Injetável Cefalosporínica (INJ 3 - UC), responsável pela produção de pós cefalosporínicos.

Relativamente ao edifício 25, a sua produção encontra-se dividida por dois sectores, sendo estes:

- Formas Sólidas Orais Penicilínicas (FSO2), responsável pela produção de comprimidos e suspensões penicilínicas;
- Unidade Injetável penicilínicas (INJ 2 - UP), responsável pela produção de pós penicilínicos.

A produção de medicamentos da família da Penicilinas e das Cefalosporinas é segregada dos restantes setores de produção, devido à sua potencial ação alergizante.

## 2 Equipamentos e Procedimentos de Limpeza

Os procedimentos de limpeza devem apresentar um elevado grau de detalhe por forma a impossibilitar quaisquer inconsistências no processo de limpeza. Estabelecer um procedimento padrão para a limpeza a efetuar em cada equipamento é uma forma de remover ou reduzir a variabilidade do procedimento de limpeza.

A este procedimento atribui-se o nome de instrução técnica de limpeza (ITL), sendo possível consultar neste documento informações relativas à preparação de soluções de detergente a utilizar, condições de armazenamento de peças ou do equipamento, e o passo-a-passo para efetuar a higienização do equipamento. No entanto, para estabelecer-se este tipo de documento é importante considerar alguns parâmetros que podem influenciar o procedimento de limpeza. [9–11,17]

**Tabela 2.1 – Parâmetros a considerar no desenvolvimento dos procedimentos de limpeza.**

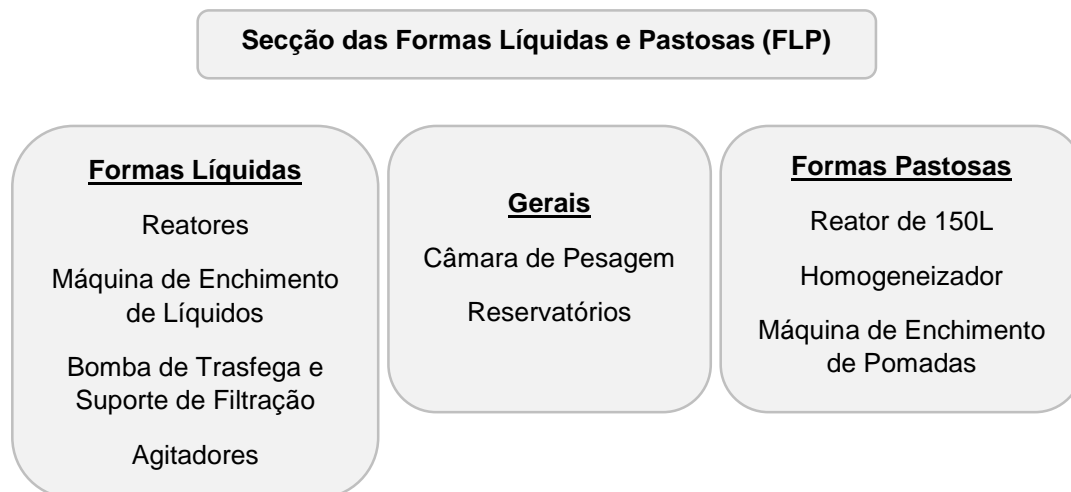
Parâmetros com influência nos procedimentos de limpeza	
Parâmetros relacionados com os equipamentos	<ul style="list-style-type: none"><li>• Identificação do equipamento a ser limpo;</li><li>• Áreas de difícil limpeza;</li><li>• Propriedades dos materiais;</li><li>• Facilidade de desmontagem;</li><li>• Equipamento fixo ou móvel.</li></ul>
Resíduos a limpar	<ul style="list-style-type: none"><li>• Limites de limpeza;</li><li>• Solubilidade dos resíduos;</li><li>• Atividade e toxicidade.</li></ul>
Parâmetros do agente de limpeza	<ul style="list-style-type: none"><li>• Detergentes disponíveis e a sua concentração;</li><li>• Propriedades de solubilidade;</li><li>• Considerações ambientais;</li><li>• Considerações relacionadas com a saúde e ambiente;</li></ul>
Técnicas de limpeza a serem utilizadas	<ul style="list-style-type: none"><li>• Limpeza manual;</li><li>• CIP (limpo no local);</li><li>• COP (limpo fora do local);</li><li>• Semi automática;</li><li>• Automática;</li><li>• Considerações relacionadas com o tempo de aplicação do procedimento de limpeza;</li></ul>
Variáveis do Processo de Limpeza	<ul style="list-style-type: none"><li>• Temperatura do agente de limpeza</li><li>• Volumes/Caudais da solução de detergente;</li><li>• Número de ciclos de limpeza;</li><li>• Tempo entre a utilização e a limpeza;</li><li>• Limpeza somente após as campanhas;</li><li>• Eficiência do operador.</li></ul>

O nível de limpeza necessário a efetuar num determinado equipamento pode variar de acordo com o produto que se pretende produzir posteriormente, sendo exigido um maior nível de cuidado na

higienização do equipamento quando se trata de limpeza de mudança de produto comparativamente a limpeza para mudança de lote do mesmo produto [18,19].

## 2.1 Apresentação dos equipamentos do setor FLP

Na figura 2.1 apresenta-se um esquema organizacional dos equipamentos em atividade no sector e para os quais se pretende validar o procedimento de limpeza.



*Figura 2.1 - Esquema de organização dos equipamentos.*

## 2.2 Descrição dos procedimentos de limpeza em caso de “Mudança de Produto”

### Câmara de Pesagem

Começar por aspirar a sala e a câmara de Pesagem (Figura 2.2). Na sala de lavagem, preparar num recipiente adequado, uma solução de lavagem por diluição de 10mL de detergente em 10L de água quente.

Na câmara de pesagem passar as mesas de apoio de lamelas com um pano embebido na solução de detergente, sendo posteriormente passadas por água quente. Relativamente à balança, esta deve ser limpa com um pano embebido em água quente.

Para finalizar a limpeza, passar as superfícies limpas com água purificada e seca-las em seguida com um pano adequado.



**Figura 2.2 – Câmara de Pesagem do FLP.**

### **Reservatórios**

- Reservatório de 250L (nº4)

Passar o reservatório (figura 2.3) com água quente, tendo o cuidado de deixar a válvula de saída do reservatório aberta. Fechar a válvula, e diluir 50mL de detergente em 50L de água quente. Utilizando um cabo extensível e um pano adequado, proceda à lavagem do equipamento.

Por forma a eliminar todo o detergente, abrir a válvula de saída e fazer passar pelo equipamento água quente, passando em seguida água purificada. Utilizando a bomba de alta pressão, mantendo ainda a válvula de saída aberta, passar o equipamento por água purificada. Posteriormente, deve desmontar a válvula de saída do reservatório e transportar as peças para a zona de lavagem.

Num recipiente adequado deve preparar-se a solução de detergente, diluindo cerca de 30mL de detergente em 10L de água quente. Com um pano embebido nesta solução, proceder a lavagem das peças da válvula. Por forma a eliminar todo o detergente, passe as peças por água quente. Antes de proceder à montagem da válvula, deve passar as peças por água purificada e álcool a 96%.



**Figura 2.3 – Reservatório de 250L (nº4).**

- Reservatório de 100L (nº3)

Iniciar a lavagem do equipamento passando o reservatório (figura 2.4) por água quente. Transfira cerca de 20L de água quente para o reservatório, diluindo em seguida cerca de 30mL de detergente. Proceda à lavagem do equipamento com um pano adequado, passando o reservatório por água quente por forma a eliminar todo o detergente.

Para terminar, passar o reservatório por água purificada, tendo o cuidado de o secar em seguida com um pano, para posterior acondicionamento.



**Figura 2.4 – Reservatório de 100L (nº3).**

## **Reatores**

- Reator de 2000L

Introduzir a mangueira de lavagem na boca do reator (figura 2.5), fazendo passar água quente pelo equipamento mantendo a válvula de saída do reator aberta.

Num recipiente adequado, preparar uma solução de lavagem por diluição de 100mL de detergente em 100L de água quente.

Fechar a válvula do reator, transferir a solução de detergente para o reator com a bomba de trasfega e ligar o agitador durante cerca de minutos. Proceder à sua lavagem com o auxílio de um pano e de um cabo extensível.

Transfira de um recipiente adequado cerca de 100L de água purificada. Passe o reator com água purificada até ao desaparecimento total da espuma do detergente utilizando a bomba de trasfega e mantendo a válvula de saída do reator aberta. Desmontar a válvula de saída do reator e transportar as peças para a zona de lavagem.

Num recipiente adequado, preparar uma solução de detergente diluindo cerca de 30mL de detergente em cerca de 10L de água quente. Lavar as peças da válvula com a solução de detergente e um pano adequado.



Enxaguar as peças com água quente de forma a eliminar todo o detergente, e em seguida passa-las por água purificada.

Passar as peças por álcool a 96%, passando um pano adequado posteriormente para a sua secagem. Termine o procedimento com a montagem da válvula.



**Figura 2.5 – Reator de 2000L.**

- Reator de 150L

Passar o reator (figura 2.6) por água quente, preparando em seguida a solução de detergente por diluição de 30mL de detergente em 20L de água. Com auxílio de um pano adequado proceder à lavagem do equipamento.

Passar o reator por água quente por forma a remover todo o detergente e logo em seguida por água purificada. Passar o equipamento com um pano adequado, acondicionando-o depois de seco.



**Figura 2.6 – Reator de 150L.**

### **Agitadores**

Transportar o equipamento (figura 2.7 e 2.8) para a sala de lavagem. Preparar uma solução de lavagem diluindo 30mL de detergente e, 10L de água quente.

Desmontar o agitador (hélice ou duplo cone), lavando-o em seguida e a todo o equipamento com a solução anteriormente preparada com auxílio de um pano. Deve ter especial atenção à zona do motor, evitando o excesso de líquido neste local.

Passar o equipamento com água quente para remover vestígios de detergente, e em seguida por água purificada. Caso seja necessária maior rapidez de secagem do equipamento passar com um pano embebido em álcool de 96%.



***Figura 2.7 – Agitador de hélice.***



***Figura 2.8 – Agitador de duplo cone.***

### **Máquina de Enchimento de Líquidos**

Num recipiente adequado, preparar uma solução de detergente diluindo cerca de 60mL de detergente em cerca de 20L de água quente.

Com a máquina (figura 2.9) em funcionamento, fazer passar a solução de detergente preparada anteriormente por todo o circuito. Desmontar os tubos de borracha (dedicados), as seringas doseadoras (êmbolos e vedantes), válvulas e agulhas de enchimento. Sempre que ocorra mudança de formato, desmontar também o prato e a guias.

Transportar todas as peças da máquina para zona de lavagem e preparar num recipiente adequado uma nova solução de detergente, diluindo cerca de 60mL de detergente em cerca de 20L de água quente.

Passar todas as partes da máquina lavadas com a solução de detergente por água quente por forma a eliminar todos os vestígios de detergente, e posteriormente por água purificada.

Caso seja necessário maior rapidez na secagem, passar a máquina com um pano embebido em álcool a 96%.

Na zona de lavagem, utilizando um recipiente adequado, preparar uma solução de detergente diluindo cerca de 30mL de detergente em cerca de 10L de água quente. Lavar todas as peças da máquina com um pano embebido na solução de detergente.

Enxaguar todas as peças com água quente de forma a eliminar todos os vestígios de detergente, e posteriormente por água purificada.

Passar todas as peças por álcool a 96% e seca-las com um pano seco. Guardar as peças num recipiente adequado junto à máquina.



***Figura 2.9 – Máquina de Enchimento de Líquidos (nº1).***

### **Homogeneizador**

Fechar a válvula de escoamento, transferido em seguida cerca de 50L de água quente para diluição de 500mL de detergente.

Colocar o homogeneizador (figura 2.10) em funcionamento durante cerca de 30 minutos, procedendo posteriormente à sua lavagem com o auxílio de um pano adequado. Retirar a solução de lavagem pela válvula de escoamento.

Abrir o depósito do homogeneizador e passar água purificada pelo equipamento para retirar todo o detergente.

Fechar a válvula de escoamento e introduzir cerca de 50L de água purificada, colocando o equipamento em funcionamento durante 15 minutos. Retirar a água pela válvula de escoamento. Abrir o depósito do homogeneizador e remover toda a água possível com um pano adequado.

Num recipiente adequado, preparar uma solução de detergente, diluindo cerca de 60mL de detergente em cerca de 20L de água quente. Lavar a estrutura do homogeneizador com a solução de detergente, passando-a posteriormente por água quente, por forma a eliminar todo o detergente.

Para terminar, passar a estrutura do homogeneizador por água quente e caso seja necessário maior rapidez na secagem, passar o homogeneizador por um pano embebido em álcool a 96%.



***Figura 2.10 – Homogeneizador.***

### **Máquina de Enchimento de Pomadas**

Desmontar o depósito, embolo/doseador, bico de distribuição e os copos transportadores, transportando em seguida todas as peças da máquina (figura 2.11) para a zona de lavagem.

Preparar uma solução de detergente, diluindo cerca de 60mL de detergente em 20L de água quente.

Com um pano adequado, lavar o resto da máquina com a solução de detergente, passando em seguida o equipamento por água quente por forma a eliminar todo o detergente.

Passar as partes da máquina anteriormente lavadas por água purificada. Caso seja necessário maior rapidez na secagem, passar a máquina com um pano embebido em álcool a 96%.

Na zona de lavagem, preparar a solução de detergente diluindo 30mL de detergente em 10L de água quente. Utilizando esta solução e um pano adequado, lavar as peças da máquina. Enxaguar todas as peças com água quente por forma a eliminar todo o detergente, passando-as em seguida por água purificada.

Passar as peças por álcool a 96%, e seca-las com um pano adequado. Posteriormente guardar as peças num recipiente adequado junto à máquina.



***Figura 2.11 – Máquina de Enchimento de Pomadas.***

### **Suporte de Filtração**

Com o suporte de filtração (figura 2.12) montado, passar 60L de água purificada pelos filtros, desmontado posteriormente os filtros e os acessórios de filtração. Proceder à esterilização dos filtros a 121°C durante 30 minutos.

Transportar os acessórios de filtração para a zona de lavagem, onde será preparada por diluição de 30mL de detergente em de 10L de água quente, a solução de detergente para lavagem destes acessórios.

Enxaguar os acessórios de filtração com água quente por forma a eliminar todos os vestígios de detergente, e posteriormente por água purificada.

Passar os acessórios por álcool a 96%, e seca-los com um pano adequado. Posteriormente guardar os acessórios num recipiente adequado junto à máquina.



***Figura 2.12 – Suporte de Filtração.***

### **Bomba de Trásfega de Líquidos (nº1)**

Num recipiente adequado, diluir cerca de 100mL de detergente em 100L de água quente para preparação da solução de detergente. Passar a solução pela bomba e respetivas mangueiras dedicadas (figura 2.13 e 2.14).

Transferir 100L de água quente para um recipiente, e passar pela bomba e mangueiras dedicadas para remover toda a espuma e detergente.

De seguida, para o mesmo recipiente, transferir 50L de água purificada e passar novamente pelo equipamento. Desmontar as mangueiras de trasfega e deixa-las secar. Após a secagem colocar um saco de polietileno nas extremidades das mangueiras de trasfega.



***Figura 2.13 - Bomba de trasfega de líquidos (nº1).***



***Figura 2.14 - Mangueiras dedicadas de trasfega de líquidos.***

Relativamente aos detergentes mencionados nos procedimentos de limpeza anteriores, é importante referir a sua especificidade, garantir a sua identificação, bem como possuir informação sobre a sua composição qualitativa e quantitativa definida, e apresentarem baixa toxicidade compatível com a sua utilização na indústria farmacêutica e alimentar.

Deve-se garantir que os panos utilizados nos procedimentos limpeza são adequados à função a que se destinam na indústria farmacêutica por forma a evitar a libertação de partículas.

No que respeita às mangueiras de trasfega de líquidos estas são dedicadas uma vez que são específicas para a produção de um único produto, existindo um conjunto de duas ou três mangueiras (número variável consoante se verifique a necessidade do produto passar pelo suporte de filtração) para cada produto fabricado.





### 3 Análise de Risco e Identificação de Piores-Casos

---

A análise de risco e identificação de piores casos é considerada uma medida proativa e preventiva, por forma a assegurar a qualidade, confiança e segurança dos medicamentos produzidos. Sendo esta considerada o primeiro passo no processo de validação de limpeza de equipamentos [4].

Este tipo de análise é feita em duas vertentes complementares, procura do equipamento pior-caso e procura do produto pior-caso, existindo a necessidade de um conhecimento do funcionamento do processo e equipamentos, como também das características dos constituintes de cada medicamento. A identificação de piores-casos permite focar o nível de esforço necessário para o desenvolvimento dos procedimentos de validação de limpeza, bem como gerir o tempo e custo associados ao mesmo.

Por questões de confidencialidade, as informações apresentadas neste capítulo e nos seguintes encontram-se codificadas, sendo apenas apresentados os valores necessários ao desenvolvimento do estudo.

#### 3.1 Seleção do Equipamento Pior-Caso

Os programas de validação de limpeza podem demorar algum tempo até estarem completos, sendo importante durante a fase de planeamento do processo de validação estabelecer prioridades relativamente aos equipamentos e aos procedimentos de limpeza a validar. Neste sentido, é aceitável agrupar equipamentos com procedimentos de limpeza e *design* semelhantes, selecionando apenas um equipamento como elemento representativo do grupo. Este elemento, que será também o equipamento a aplicar o processo de validação, deve de apresentar maior dificuldade de limpeza relativamente aos restantes, sendo considerado o equipamento pior-caso.

O agrupamento de equipamentos com o mesmo procedimento de limpeza implica necessariamente a utilização do mesmo agente de limpeza, condições de trabalho e parâmetros semelhantes (função, materiais de construção e fabrico dos mesmo produtos) [19].

A seleção do equipamento pior-caso pode ser efetuada de acordo com os seguintes critérios:

- Área do equipamento;
- Frequência de produção;
- Características do equipamento.

No entanto, a identificação do equipamento pior-caso nem sempre é imediata sendo necessário recorrer a uma análise de risco, onde se avalia a especificidade, grau de utilização e a quantidade de produtos produzidos no equipamento. O elemento representativo de um certo grupo será aquele que apresentar um maior índice de risco.

O índice de risco pode ser calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Índice de Risco} = I.R. \cdot \text{Especificidade} \times I.R. \cdot \text{Grau de utilização} \times I.R. \cdot \text{Prod Produzidos} \quad \text{Equação 3.1}$$

Onde, I.R. é o índice de risco de um determinado parâmetro, como pode ser observado nas tabelas seguintes (tabela 3.1-3.3).

**Tabela 3.1 – Índices de risco para a especificidade do equipamento.**

Especificidade do equipamento	Índice de risco
Sem contacto com substâncias Ativas	1
Equivalente a outros em função e ITL	2
Novo	3
Único	4

**Tabela 3.2 – Índices de risco para o grau de utilização do equipamento.**

Grau de utilização	Índice de risco
Nenhum/Inativo	1
Baixo ( $\leq 30\%$ )	2
Médio (31-70%)	3
Alto ( $> 70\%$ )	4

**Tabela 3.3 – Índices de risco para a quantidade de produtos diferentes produzidos por equipamento.**

Quantidade de produtos produzidos	Índice de risco
Nenhum/Inativo	1
Baixa ( $\leq 3$ )	2
Média (4-8)	3
Alta ( $> 8$ )	4

Pode ser ainda identificado um pior-caso se o equipamento em questão for único ou apresentar uma ITL diferente de equipamentos semelhantes.

Na tabela 3.4 pode então consultar-se quais os equipamentos pior-caso por se apresentarem como equipamentos únicos ou possuírem ITLs diferentes dos restantes equipamentos do agrupamento, e também, os agrupamentos efetuados.

**Tabela 3.4 – Identificação de agrupamento de equipamentos e de equipamentos com ITL única.**

Equipamentos com ITL única	Equipamentos agrupados
Câmara de Pesagem	Reservatórios de 250L e 350L
Reator 150L	Reservatórios de 100L
Homogeneizador	Reator 1000L e 2000L
Máquina de Enchimento de Pomadas	Agitadores
Bomba de Trasfega de Líquidos (nº1)	Máquinas de Enchimento de Líquidos

### **Seleção do Reservatório Pior-Caso**

Tendo sido encontradas diferenças nos procedimentos de limpeza efetuados para os reservatórios de 100L relativamente aos procedimentos efetuados para os restantes reservatórios, houve a necessidade de serem efetuados dois agrupamentos.

Relativamente aos reservatórios de 250L e 350L (tabela 3.5), apresentando o mesmo índice de risco tanto para a especificidade como grau de utilização, o parâmetro que poderia provocar alterações nos resultados seria a quantidade de produtos produzidos. No entanto, ainda que se verifiquem diferenças relativas à quantidade de produtos produzidos, estas quantidades recaem no mesmo intervalo estabelecido para atribuição de um valor de índice de risco. Assim, o elemento representativo do agrupamento de reservatórios será o equipamento onde se verifique a produção de maior número de produtos, sendo este o reservatório 250L (nº4). Caso não fossem verificadas quaisquer diferenças relativamente ao ponto anteriormente referido, o equipamento pior-caso seria o equipamento que apresentasse maior área.

***Tabela 3.5 - Análise de risco para o agrupamento de reservatórios de 250L e 350L.***

<b>Equipamentos</b>	<b>I.R. Especificidade</b>	<b>I.R. Grau de Utilização</b>	<b>I.R. Quantidade de Produtos Produzidos</b>	<b>Índice de Risco</b>
Reservatório 350L (nº1)	2	4	3	24
Reservatório 350L (nº2)	2	4	3	24
Reservatório 250L (nº1)	2	4	3	24
Reservatório 250L (nº2)	2	4	3	24
Reservatório 250L (nº3)	2	4	3	24
Reservatório 250L (nº4)	2	4	3	24
Reservatório 250L (nº5)	2	4	3	24

Já para o agrupamento de reservatórios de 100L, a análise de risco apresentada na tabela 3.6 permite identificar o equipamento pior-caso como sendo o reservatório 100L (nº3), destacando-se dos restantes também pela quantidade de produtos produzidos neste equipamento.

***Tabela 3.6 - Análise de risco para o agrupamento de reservatórios de 100L.***

<b>Equipamentos</b>	<b>I.R. Especificidade</b>	<b>I.R. Grau de Utilização</b>	<b>I.R. Quantidade de Produtos Produzidos</b>	<b>Índice de Risco</b>
Reservatório 100L (nº1)	2	3	3	18
Reservatório 100L (nº2)	2	4	3	24
Reservatório 100L (nº3)	2	4	4	32

### **Seleção do Reator Pior-Caso**

Da análise de risco resultante ao agrupamento de reatores apresentada na tabela 3.7 pode verificar-se que o equipamento pior-caso será o reator de 2000L, tendo apresentado maior índice de risco associado às diferenças apresentadas no grau de utilização e quantidade de produtos produzidos.

**Tabela 3.7 – Análise de risco para o agrupamento de reatores.**

<b>Equipamentos</b>	<b>I.R. Especificidade</b>	<b>I.R. Grau de Utilização</b>	<b>I.R. Quantidade de Produtos Produzidos</b>	<b>Índice de Risco</b>
Reator 2000L	2	3	3	18
Reator 1000L	2	2	2	8

### **Seleção do Agitador Pior-Caso**

Ainda que o agitador de duplo cone apresente maior frequência de utilização relativamente ao agitador de hélice (tabela 3.8), ambos os valores recaem no mesmo intervalo de atribuição de índice de risco para o grau de utilização. No entanto, este equipamento é apenas utilizado para a produção do produto 13, não se verificando a possibilidade de contaminação cruzada de substâncias ativas. Já o para o agitador de hélice, o panorama apresentado é distinto, verificando-se a produção de maior número de produtos (consultar Apêndice I, tabela 11.4), existindo assim a possibilidade de contaminação cruzada, mas com uma frequência de produção baixa, dificultando o procedimento de validação. Assim, o agrupamento de agitadores é um caso especial no que se refere aos procedimentos de validação, no sentido em que ambos os equipamentos serão submetidos ao processo de validação. Em capítulos seguintes a abordagem à validação de ambos os equipamentos será efetuada com maior detalhe.

**Tabela 3.8 - Análise de risco para o agrupamento de agitadores.**

<b>Equipamentos</b>	<b>I.R. Especificidade</b>	<b>I.R. Grau de Utilização</b>	<b>I.R. Quantidade de Produtos Produzidos</b>	<b>Índice de Risco</b>
Agitador de Hélice	2	2	2	8
Agitador Duplo Cone	2	2	2	8

### **Seleção da Máquina de Enchimento de Líquidos Pior-Caso**

De acordo com a análise de risco apresentada na tabela 3.9, verifica-se que a máquina de enchimento de líquidos (nº1) apresenta maior índice de risco associado às diferenças apresentadas no grau de utilização e quantidade de produtos produzidos.

**Tabela 3.9 - Análise de risco para o agrupamento de Máquinas de Enchimento de Líquidos.**

<b>Equipamentos</b>	<b>I.R. Especificidade</b>	<b>I.R. Grau de Utilização</b>	<b>I.R. Quantidade de Produtos Produzidos</b>	<b>Índice de Risco</b>
Maq. de Enchimento de Líquidos (nº1)	2	3	3	18
Maq. de Enchimento de Líquidos (nº2)	2	2	2	8

## **3.2 Seleção do Produto Pior-Caso**

À utilização de equipamentos multiproduto está associada a identificação de produtos pior-caso. Uma vez que no mesmo equipamento ocorre a produção de diferentes produtos, é necessário

garantir que não se verifica contaminação dos produtos entre si, por aplicação de um procedimento de limpeza inadequado.

Começa-se por identificar o produto pior-caso A, que de um grupo será o produto que apresentar maior risco para a contaminação dos restantes produtos a passar no mesmo equipamento. Para identificação deste produto avaliam-se diferentes fatores, sendo estes [9,12,19]:

- Forma galénica do produto;
- Concentração da substância ativa na formulação do produto;
- Solubilidade da substância ativa em água;
- Dificuldade de remoção;
- Frequência de produção;
- Toxicidade do produto.

A seleção do produto pior-caso A pode ser feita através de uma análise de risco, por avaliação de alguns dos parâmetros anteriormente referidos. Assim, o produto pior-caso A de um certo equipamento será aquele que apresentar maior índice de risco.

O índice de risco pode ser calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Índice Risco} = I.R._{[SA]} \times I.R._{Solub. SA} \times I.R._{Freq. Produção} \times I.R._{Toxicidade} \times I.R._{Dif. Remoção} \quad \textbf{Equação 3.2}$$

Onde, I.R. é o índice de risco de um determinado parâmetro, como pode ser observado nas tabelas seguintes (tabela 3.10-3.14).

**Tabela 3.10 – Índices de risco de concentração de substância ativa no produto.**

Concentração de SA (mg SA/mL produto ou mg de SA/g de produto)	Índice de risco
Sem substância ativa	1
Concentração baixa ( $\leq 30\%$ )	2
Concentração média (31-70%)	3
Concentração alta ( $> 71\%$ )	4

**Tabela 3.11 – Índices de risco de solubilidade em água da substância ativa do produto.**

Solubilidade	Índice de risco
Muito solúvel ( $> 100\text{g/L}$ )	1
Solúvel (10-100g/L)	2
Pouco solúvel (1-10g/L)	3
Insolúvel/Muito pouco solúvel ( $< 1\text{g/L}$ )	4

**Tabela 3.12 – Índices de risco de frequência de produção do produto (nº lotes/ano).**

<b>Frequência de produção</b>	<b>Índice de risco</b>
Sem produção	1
Frequência baixa (<3 lotes)	2
Frequência Média (3-15 lotes)	3
Frequência alta (>15 lotes)	4

**Tabela 3.13 – Índices de risco de toxicidade do produto.**

<b>Toxicidade (LD<sub>50</sub>)</b>	<b>Índice de risco</b>
Sem toxicidade	1
Baixa (>5000mg/Kg)	2
Média (5000-600mg/Kg)	3
Alta (<600mg/Kg)	4

Sendo o conceito de dose letal (LD<sub>50</sub>) relativo à dose (em mg/Kg) necessária para se verificar a morte de 50% da população animal em teste.

**Tabela 3.14 – Índices de risco de dificuldade de remoção do produto.**

<b>Dificuldade de remoção</b>	<b>Índice de risco</b>
Fácil de remover	1
Dificuldade média	2
Difícil de remover	3
Muito difícil de remover	4

Consequentemente, para ser avaliada a possibilidade de contaminação de outros produtos com resíduos do produto A, é necessário compreender que esta contaminação poderá causar diferentes efeitos em cada um dos produtos. Da mesma forma que o produto pior-caso A é apresentado como o produto com maior risco para contaminar os restantes, existirá um produto pior-caso B correspondente ao produto processado no equipamento com menor tamanho de lote, que por utilização doses terapêuticas muito elevadas será o produto onde a ocorrência de contaminação será mais prejudicial.

Então, para a identificação do produto pior-caso B serão avaliados os seguintes os seguintes fatores [12]:

- Tamanho de lote do produto;
- Dose terapêutica diária;
- Via de administração.

### **Câmara de Pesagem**

De acordo com análise de risco apresentada na tabela 3.15, por apresentar maior índice de risco relativamente aos restantes produtos, o produto pior-caso A será o produto 13. Ainda que este resultado esteja dependente de vários parâmetros com índices elevados, verifica-se que este produto é o único a apresentar uma combinação de elevado risco de toxicidade da substância ativa e de baixa solubilidade da substância ativa em água.

***Tabela 3.15 – Análise de risco para os produtos a passar pela câmara de pesagem.***

<b>Análise de Risco</b>						
<b>Produto</b>	<b>I.R. [SA]</b>	<b>I.R. Solubilidade SA</b>	<b>I.R. Frequência de produção</b>	<b>I.R. Toxicidade</b>	<b>I.R. Dificuldade de remoção</b>	<b>Índice de Risco</b>
Produto 1	2	2	3	3	2	72
Produto 2	2	2	2	3	2	48
Produto 3	2	4	3	2	3	144
Produto 4	2	4	3	2	4	192
Produto 5	2	4	2	3	3	144
Produto 6	2	1	3	4	1	24
Produto 7	2	4	2	3	3	144
Produto 8	2	3	1	2	2	24
Produto 9	2	3	1	2	2	24
Produto 10	2	3	3	2	2	72
Produto 11	2	4	2	3	3	144
Produto 12	2	4	2	3	3	144
Produto 13	2	4	3	4	3	288

Relativamente ao produto pior-caso B, procura-se o produto com menor tamanho de lote, podendo verificar-se no Apêndice I, tabela 11.1, que o produto 8 e 9 apresentam ambos o menor tamanho de lote.

No entanto, as características dos dois produtos são semelhantes, seja a nível da via de administração como da dose terapêutica diária, o que continua a impossibilitar a identificação do produto pior-caso B.

Sendo este estudo baseado em informações relativas à produção dos últimos anos, e tendo em conta que não se verificou a produção de ambos os produtos no ano de 2014, a escolha do produto pior-caso B efetuou-se em concordância com a produção já decorrente durante o ano de 2015. Assim, tendo-se verificado apenas a produção do produto 9, será este o produto com maior risco de contaminação, sendo então o produto pior-caso B.

### **Reservatório de 250L (nº4)**

De acordo com análise de risco apresentada na tabela 3.16, por apresentar maior índice de risco relativamente aos restantes produtos, o produto pior-caso A será o produto 13. Ainda que este

resultado esteja dependente de vários parâmetros com índices elevados, verifica-se que este produto é o único a apresentar uma combinação de elevado risco de toxicidade da substância ativa e de baixa solubilidade da substância ativa em água.

**Tabela 3.16 - Análise de risco para os produtos a passar pelo reservatório de 250L (nº4).**

<b>Análise de Risco</b>						
<b>Produto</b>	<b>I.R. [SA]</b>	<b>I.R. Solubilidade SA</b>	<b>I.R. Frequência de produção</b>	<b>I.R. Toxicidade</b>	<b>I.R. Dificuldade de remoção</b>	<b>Índice de Risco</b>
Produto 1	2	2	3	3	2	72
Produto 2	2	2	2	3	2	48
Produto 3	2	4	3	2	3	144
Produto 4	2	4	3	2	4	192
Produto 5	2	4	2	3	3	144
Produto 6	2	1	3	4	1	24
Produto 7	2	4	2	3	3	144
Produto 13	2	4	3	4	3	288

Relativamente ao produto pior-caso B, procura-se o produto com menor tamanho de lote, podendo verificar-se no Apêndice I, tabela 11.15 que o produto pior-caso B será então o produto 6.

### **Reservatório de 100L (nº3)**

Na tabela 11.18, apresentada no Apêndice I, encontra-se uma listagem dos produtos que passam por este reservatório durante os seus processos de produção. No entanto, este equipamento pode ser utilizado em diversas etapas, não sendo necessariamente a mesma para cada um dos produtos, até porque a fase de preparação é distinta para cada produto. Para alguns destes produtos, este reservatório é utilizado numa fase muito inicial da sua preparação, como para a pesagem de excipientes, não existindo realmente contato com substâncias ativas ou produto final. Por esta razão, para os estudos de análise de risco serão apenas considerados os produtos onde se verifica contato do equipamento com substância ativa.

Relativamente ao produto pior-caso A, os resultados apresentados na tabela 3.17 permitem retirar diversas conclusões, uma vez que o índice de risco mais elevado surge para a maioria dos produtos. Dos parâmetros apresentados, apenas dois poderiam provocar alterações nos resultados obtidos, sendo estes a solubilidade da substância ativa em água (consultar Apêndice I, tabela 11.18) e a frequência de produção anual de cada um dos produtos.

No entanto, ainda que se verifiquem diferenças nos valores destes parâmetros entre os produtos, no que respeita aos intervalos estabelecidos para atribuição de índices de risco estes valores recaem no mesmo intervalo. Assim, por forma a ser possível identificar um produto pior-caso devem estudar-se ambos os parâmetros em separado por for a conseguir reduzir gradualmente o número de produtos estudo.



**Tabela 3.17 - Análise de risco para os produtos a passar pelo reservatório de 100L (nº3).**

<b>Análise de Risco</b>						
<b>Produto</b>	<b>I.R. [SA]</b>	<b>I.R. Solubilidade SA</b>	<b>I.R. Frequência de produção</b>	<b>I.R. Toxicidade</b>	<b>I.R. Dificuldade de remoção</b>	<b>Índice de Risco</b>
Produto 5	2	4	2	3	3	144
Produto 6	2	1	3	4	1	24
Produto 7	2	4	2	3	3	144
Produto 11	2	4	2	3	3	144
Produto 12	2	4	2	3	3	144

Sendo a solubilidade um dos parâmetros mais importantes na seleção de um produto pior-caso A será este o parâmetro primeiramente estudado. De acordo com as solubilidades apresentadas na tabela 3.18, verifica-se que o produto 5 apresenta maior solubilidade relativamente aos restantes produtos, podendo então excluir-se este produto do estudo.

**Tabela 3.18 – Solubilidade de SA em água para os produtos em estudo.**

<b>Produto</b>	<b>Solubilidade da SA em água (g/L)</b>
Produto 5	0,1-1
Produto 7	<0,1
Produto 11	<0,1
Produto 12	SA 7 <0,1 SA 9 >1000

Interessa agora estudar a frequência de produção dos produtos 7, 11 e 12, sendo considerado produto pior-caso A aquele que apresentar maior frequência de produção. Ainda que estes produtos não apresentem grande frequência de produção, verifica-se que o número de lotes produzido por ano do produto 11 é superior em apenas um lote aos produtos 7 e 12. Sendo assim, o produto 11 o produto pior-caso A.

Para o produto pior-caso B, procura-se o produto com menor tamanho de lote, podendo verificar-se no Apêndice I, tabela 11.18, que o produto pior-caso B será então o produto 6.

### **Reator de 2000L**

De acordo com análise de risco apresentada na tabela 3.19, por apresentar maior índice de risco relativamente aos restantes produtos, o produto pior-caso A será o produto 13. Ainda que este resultado esteja dependente de vários parâmetros com índices elevados, verifica-se que este produto é o único a apresentar uma combinação de elevado risco de toxicidade da substância ativa e de baixa solubilidade da substância ativa em água.

**Tabela 3.19 - Análise de risco para os produtos a passar pelo reator de 2000L.**

<b>Análise de Risco</b>						
<b>Produto</b>	<b>I.R. [SA]</b>	<b>I.R. Solubilidade SA</b>	<b>I.R. Frequência de produção</b>	<b>I.R. Toxicidade</b>	<b>I.R. Dificuldade de remoção</b>	<b>Índice de Risco</b>
Produto 1	2	2	3	3	2	72
Produto 2	2	2	2	3	2	48
Produto 3	2	4	3	2	3	144
Produto 4	2	4	3	2	4	192
Produto 13	2	4	3	4	3	288

Relativamente ao produto pior-caso B, pode verificar-se no Apêndice I, tabela 11.9, a impossibilidade de identificação do produto pior-caso B pelo menor tamanho de lote. O produto pior-caso B será então o produto que apresentar maior posologia diária.

**Tabela 3.20 – Posologia diária dos produtos a passar no reator de 2000L.**

<b>Produto</b>	<b>Posologia diária (mL/dia)</b>
Produto 1	20
Produto 2	30
Produto 3	15
Produto 4	30

De acordo com a informação apresentada na tabela 3.20, contínua a verificar-se a impossibilidade de identificar um produto como produto pior-caso B, especialmente porque além de apresentarem o mesmo tamanho de lote, a mesma posologia ou dose terapêutica diária, apresentam também a mesma via de administração. No entanto, como será apresentado no capítulo 4, as informações necessárias relativamente ao produto pior-caso B para a determinação do limite analítico serão o tamanho de lote e máxima dose terapêutica diária, e neste caso em particular independentemente da escolha pelo produto 2 ou produto 4, não se verificará quaisquer alterações a nível de cálculo.

### **Agitador de Hélice**

Relativamente ao produto pior-caso A, de acordo com os resultados apresentados na tabela 3.21 verifica-se que o índice de risco mais elevado surge tanto para o produto 5 como para o produto 7. O parâmetro que poderia provocar alterações nos resultados seria a solubilidade da substância ativa em água. No entanto, ainda que se verifique que o produto 5 apresenta valores solubilidade ligeiramente superiores ao produto 7 (consultar Apêndice I, tabela 11.4), estes valores recaem no mesmo intervalo estabelecido para atribuição de um valor de índice de risco. Assim, o produto pior-caso A será o produto 7 por apresentar menor solubilidade da substância ativa em água.

**Tabela 3.21 - Análise de risco para os produtos a passar pelo agitador de hélice.**

<b>Análise de Risco</b>						
<b>Produto</b>	<b>I.R. [SA]</b>	<b>I.R. Solubilidade SA</b>	<b>I.R. Frequência de produção</b>	<b>I.R. Toxicidade</b>	<b>I.R. Dificuldade de remoção</b>	<b>Índice de Risco</b>
Produto 5	2	4	2	3	3	144
Produto 6	2	1	3	4	1	24
Produto 7	2	4	2	3	3	144

Relativamente ao produto pior-caso B, procura-se o produto com menor tamanho de lote, podendo verificar-se no Apêndice I, tabela 11.4, que o produto pior-caso B será então o produto 6.

### **Máquina de Enchimento de Líquidos (nº1)**

De acordo com análise de risco apresentada na tabela 3.22, por apresentar maior índice de risco relativamente aos restantes produtos, o produto pior-caso A será o produto 13. Ainda que este resultado esteja dependente de vários parâmetros com índices elevados, verifica-se que este produto é o único a apresentar uma combinação de elevado risco de toxicidade da substância ativa e de baixa solubilidade da substância ativa em água.

**Tabela 3.22 - Análise de risco para os produtos a passar pela máquina de enchimento de líquidos (nº1).**

<b>Análise de Risco</b>						
<b>Produto</b>	<b>I.R. [SA]</b>	<b>I.R. Solubilidade SA</b>	<b>I.R. Frequência de produção</b>	<b>I.R. Toxicidade</b>	<b>I.R. Dificuldade de remoção</b>	<b>Índice de Risco</b>
Produto 1	2	2	3	3	2	72
Produto 2	2	2	2	3	2	48
Produto 3	2	4	3	2	3	144
Produto 4	2	4	3	2	4	192
Produto 7	2	4	2	3	3	144
Produto 13	2	4	3	4	3	288

Relativamente ao produto pior-caso B, procura-se o produto com menor tamanho de lote, podendo verificar-se no Apêndice I, tabela 11.2, que o produto pior-caso B será então o produto 7.

### **Homogeneizador e Máquina de Enchimento de Pomadas**

Relativamente ao produto pior-caso A, de acordo com os resultados apresentados na tabela 3.23 verifica-se que o índice de risco mais elevado surge tanto para o produto 11 como para o produto 12. Tendo em conta as características dos produtos em questão, o parâmetro que poderia provocar alterações nos resultados seria a frequência de produção. No entanto, ainda que se verifiquem diferenças relativamente ao número de lotes de cada produto produzidos por ano, estes

valores recaem no mesmo intervalo estabelecido para atribuição de um valor de índice de risco. Assim, o produto pior-caso A será o produto 11 por apresentar maior frequência de produção relativamente ao produto 12.

**Tabela 3.23 - Análise de risco para os produtos a passar pelo homogeneizador e máquina de enchimento de pomadas.**

<b>Análise de Risco</b>						
<b>Produto</b>	<b>I.R. [SA]</b>	<b>I.R. Solubilidade SA</b>	<b>I.R. Frequência de produção</b>	<b>I.R. Toxicidade</b>	<b>I.R. Dificuldade de remoção</b>	<b>Índice de Risco</b>
Produto 8	2	3	1	2	2	24
Produto 9	2	3	1	2	2	24
Produto 10	2	3	3	2	2	72
Produto 11	2	4	2	3	3	144
Produto 12	2	4	2	3	3	144

À semelhança do que terá sido anteriormente referido para o produto pior-caso B da câmara de pesagem, o mesmo se verifica relativamente ao produto pior-caso B do homogeneizador e da máquina de enchimento de pomadas. Sendo o produto pior-caso B o produto 9, pelas razões já apresentadas.

Sintetizando, na tabela 3.24 apresentam-se os produtos pior-caso A e B de acordo com o respetivo equipamento.

**Tabela 3.24 – Resumo dos produtos pior-caso por equipamento.**

<b>Equipamentos</b>	<b>Produto pior-caso A</b>	<b>Produto pior-caso B</b>
<b>Gerais</b>		
Câmara de Pesagem	Produto 13	Produto 9
Reservatório 250L (4)	Produto 13	Produto 6
Reservatório 100L (3)	Produto 11	Produto 6
<b>Formas Líquidas</b>		
Reator 2000L	Produto 13	Produto 2/Produto 4
Agitador de Hélice	Produto 5	Produto 6
Máquina de Enchimento de Líquidos (nº1)	Produto 13	Produto 7
<b>Formas Pastosas</b>		
Homogeneizador e Máquina de Enchimento de Pomadas	Produto 11	Produto 9

## 4 Identificação de Pontos Críticos


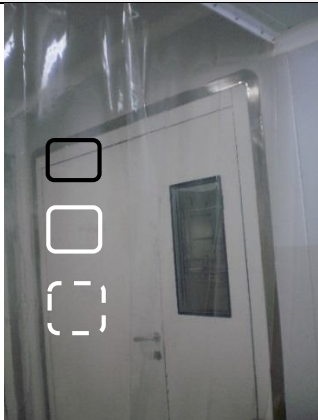


O conhecimento da ITL e do funcionamento do equipamento a validar, é essencial para determinar quais os locais de maior dificuldade de limpeza. A estes locais atribui-se o nome de pontos críticos, sendo estes os pontos onde serão efetuadas recolhas de amostras para procura de possíveis contaminações.

A dificuldade associada à limpeza destes locais está relacionada com o formato do equipamento, a possibilidade de este ser ou não desmontável, e com as próprias características dos produtos a passar no equipamento.

Neste capítulo serão identificados os pontos críticos para os diversos equipamentos do setor FLP de acordo com as amostragens que se pretende realizar (tabelas 4.1-4.10 e figuras 4.1-4.4).

### Câmara de Pesagem



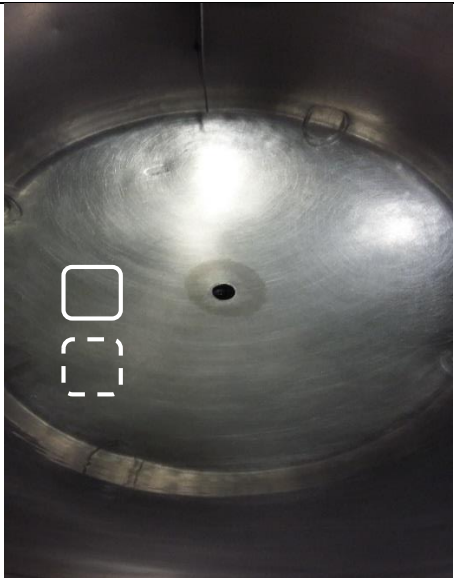
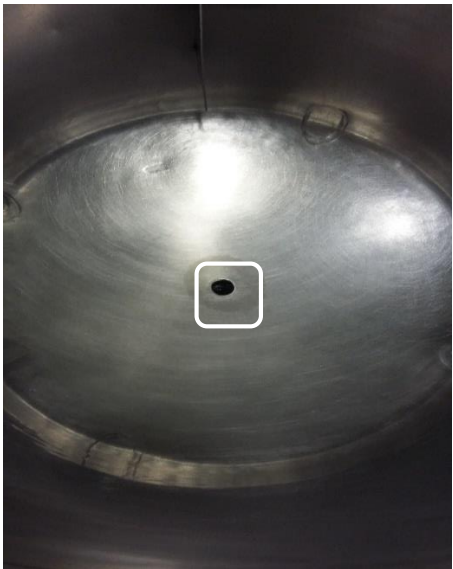
**Tabela 4.1 – Pontos críticos de amostragem da câmara de pesagem para determinação de resíduos de SA (marcação branca a cheio e tracejado, amostra A e B, respetivamente) e atividade microbiológica (marcação a preto).**

Câmara de Pesagem	
	
1 – Balança	2 - Lamelas
	
3 – Bancada	4 - Parede

## Reservatórios

- Reservatório de 250L (4)

**Tabela 4.2 – Pontos críticos de amostragem do reservatório de 250L (nº4) para determinação de resíduos de SA (marcação branca a cheio e tracejado, amostra A e B, respetivamente).**

Reservatório de 250L (nº4)	
	
1 – Parede do Reservatório	2 – Válvula de saída
	
3 – Fundo do Reservatório	4 – Tubagem de Escoamento

Como alguns dos pontos críticos para recolha de amostras são coincidentes para a procura de resíduos de SA e determinação da atividade microbiológica, como é o caso da válvula de saída e da tubagem de escoamento, e tendo também em conta que ambos os locais possuem uma superfície pequena para a amostragem, surgem alguns problemas relativamente às metodologias de amostragem a aplicar.

Tratando-se de espaços pequenos e circulares, as amostragens microbiológica não poderão ser efetuadas com placas de contato, podendo ser utilizadas zaragatoas. No entanto, a recolha de amostras de SA será efetuada com *swabs*, o que impossibilita a recolha de ambas as amostras após limpeza de mudança de produto aquando a produção do produto pior-caso A.



Assim, por forma a ser possível a recolha de ambas as amostras, optou-se por utilizar dois métodos distintos de recolha de amostras, sendo as amostras de SA recolhidas através da utilização de *swabs* e as amostras microbiológicas feitas por recolha de águas. Na figura 4.1, identifica-se o local de amostragem ao reservatório.



**Figura 4.1 - Identificação a branco da área de amostragem do reservatório de 250L (nº4) para determinação de resíduos da atividade microbiológica.**

- Reservatório de 100L (3)

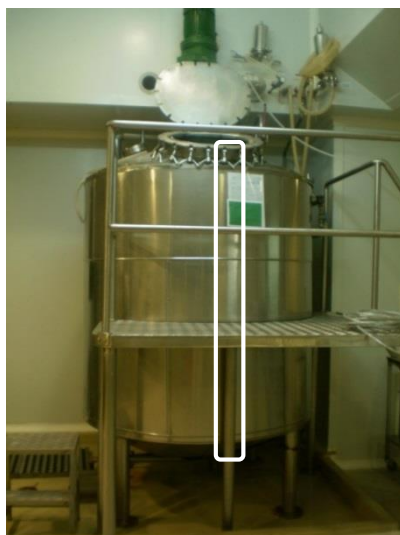
**Tabela 4.3 - Pontos críticos de amostragem do reservatório de 100L (nº3) para determinação de resíduos de SA (marcação branca a cheio e tracejado, amostra A e B, respetivamente) e atividade microbiológica (marcação a preto).**

Reservatório de 100L (3)	
	
1 – Parede do Reservatório	2 – Fundo do Reservatório

## **Reatores**

- **Reator 2000L**





Tendo em conta a área do equipamento e a pouca acessibilidade aos pontos considerados críticos, devem utilizar-se métodos de amostragem que permitam a recolha de amostras representativas de toda a superfície do equipamento e que consigam contatar com os pontos críticos apenas pela passagem e recolha de amostras de água ou solvente. Na figura 4.2, identifica-se o local de amostragem ao reator.



**Figura 4.2 - Identificação a branco da área de amostragem do reator de 2000L para determinação de resíduos de SA e atividade microbológica.**

- **Reator 150L**

**Tabela 4.4 - Pontos críticos de amostragem do reator de 150L para determinação de resíduos da atividade microbológica.**

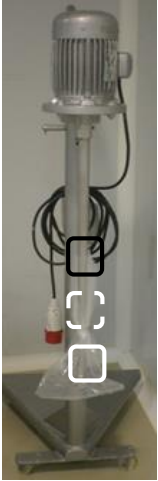

Reator 150L			
			
1— Parede do Reator	2— Tubagem de Escoamento (amostragem com zaragatoa)	3— Torneira de saída (amostragem com zaragatoa)	4— Fundo do Reator



## Agitadores





- Agitador de Hélice

**Tabela 4.5 - Pontos críticos de amostragem do agitador de hélice para determinação de resíduos de SA (marcação branca a cheio e tracejado, amostra A e B, respectivamente) e atividade microbiológica (marcação a preto).**

Agitador de Hélice	
	
1 – Veio central (eixo)	2 - Hélice

- Agitador de Duplo Cone

**Tabela 4.6 - Pontos críticos de amostragem do agitador de duplo cone para determinação da atividade microbiológica.**

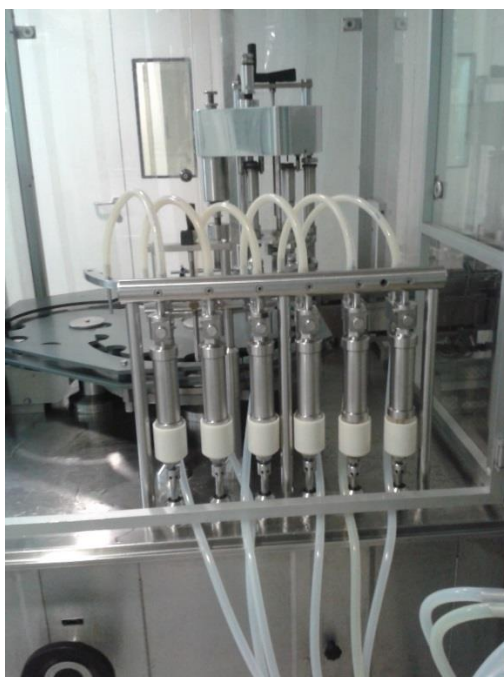
Agitador de Duplo Cone			
			
	2 – Cone Superior		
		3 – Cone Inferior	4 – Disco Central
1 – Veio central (eixo)			

### **Máquina de Enchimento de Líquidos (nº1)**

Para a máquina de enchimento de líquidos (nº1) (figura 4.3) a cada conjunto seringa corresponde uma amostra. As primeiras amostras a recolher serão então as amostras para procura de resíduos de agentes de limpeza e determinação de atividade microbiológica. Tendo em conta que o doseamento de líquidos é parcial, no sentido em que no enchimento de produtos 1 frasco terá de passar pelos 6 conjuntos de seringa para que fique com o seu volume completo, não será possível a recolha das quatro amostras em simultâneo, uma vez que apoiados os frascos no prato estes seriam deslocados, não correspondendo então à amostra pretendida.

Ambas as amostras são efetuadas por recolha de águas, no entanto em caso da presença de resíduos de agentes de limpeza, a passagem sucessiva de água pelo conjunto seringa eliminaria parte ou a totalidade destes resíduos, sendo assim importante que esta seja a primeira recolha a efetuar, correspondendo um conjunto à amostra A e outro à amostra B. Para outros dois conjuntos, ainda com a passagem de água a decorrer devem ser recolhidas mais duas amostras, A e B, para contagem microbiológica.



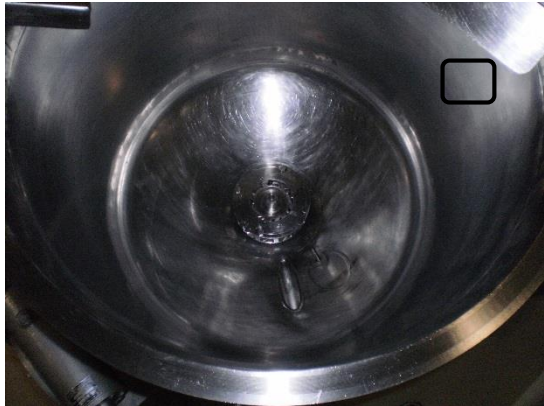
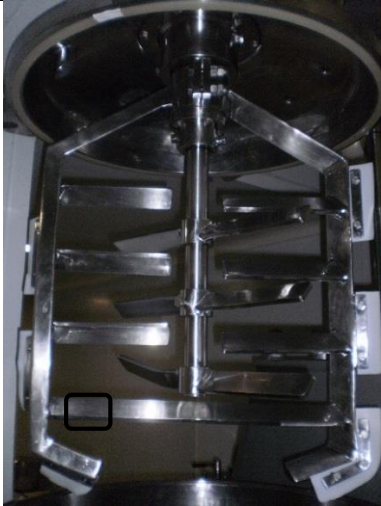

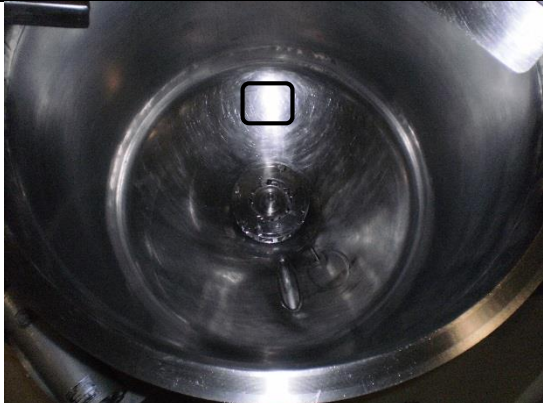
Ainda que não seja a prática mais correta, como as tubagens do equipamento demoram bastante tempo a secar e para a amostragem seguinte a tubagem deve estar seca, enquanto o equipamento esteve a funcionar com a passagem de água, os dois conjuntos de seringa a utilizar para a recolha de amostras de procura de SA não estiveram a puxar água. Não havendo problema do contato do equipamento com água, os conjuntos de seringas anteriormente utilizados estarão a puxar água e a verter para cima do prato rotativo, enquanto os outros dois conjuntos estarão a puxar solvente para a recolha das amostras A e B, para procura de resíduos de SA.



***Figura 4.3 - Identificação da área de amostragem da máquina de enchimento de líquidos (nº1) para determinação de resíduos de SA e atividade microbiológica.***

## Homogeneizador

**Tabela 4.7 - Pontos críticos de amostragem do Homogeneizador para determinação da e atividade microbiológica (marcação a preto).**

Homogeneizador (Amostragem Microbiológica)	
	
1 – Borracha	2 – Turbina (amostragem com zaragatoa)
	
3 – Prede do Homogeneizador	4 – Pá do agitador
	
5 – Válvula de saída (amostragem com zaragatoa ao gargalo do homogeneizador – sem a válvula montada)	6 – Fundo do Homogeneizador



**Tabela 4.8 - Pontos críticos de amostragem do Homogeneizador para determinação de resíduos de SA (marcação branca a cheio e tracejado, amostra A e B, respetivamente).**




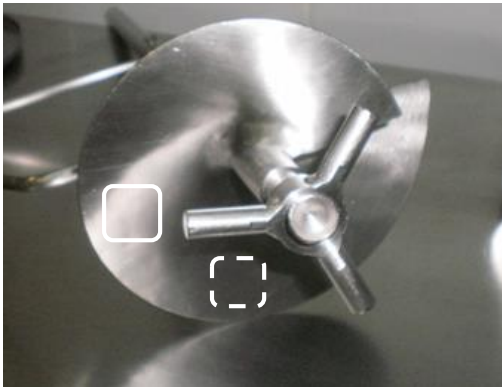

Homogeneizador (Procura de SA)	
	
1 – Turbina	2 – Parede do Homogeneizador
	
3 - Tubagem de Escoamento	4 – Fundo do Homogeneizador
	
5 – Agitador	6 – Válvula de Saída

## Máquina de Enchimento de Pomadas

**Tabela 4.9 - Pontos críticos de amostragem da Máquina de Enchimento de Pomadas para determinação da atividade microbológica (marcação a preto).**

Máquina de Enchimento de Pomadas (Amostragem Microbiológica)	
	
1 - Escoamento do depósito (interior do gargalo, em ponta apostada ao local de procura de SA) (amostragem com zaragatoa)	2 – Parede do Depósito
	
3 – Fundo do Depósito	4 - Agitador
	
5 – Peça do conjunto de distribuição (amostragem com zaragatoa)	

**Tabela 4.10 - Pontos críticos de amostragem a Máquina de Enchimento de Pomadas para determinação de resíduos de SA (marcação branca a cheio e tracejado, amostra A e B, respetivamente).**

Máquina de Enchimento de Pomadas (Procura de SA)	
	
1 – Fundo do Depósito	2 – Parede do Depósito
	
3 – Escoamento do depósito	4 - Agitador
	
5 – Peça do conjunto de distribuição	

### **Bomba de Trasfega de Líquidos (nº1)**

A única forma de se obter amostras representativas das possíveis contaminações ao longo de todo o comprimento da mangueira (Figura 4.4) é através da recolha de amostras de água, sendo para isto necessário pôr a bomba de trasfega de líquidos a funcionar. Tendo em conta a pressão que a água irá ter à saída da mangueira, os procedimentos de lavagem de frascos efetuados na recolha de amostras de resíduos de agentes de limpeza deverão ser efetuados em laboratório com água Milli-Q. O restante procedimento de amostragem decorrerá de acordo com o que se descreve no capítulo 6.



***Figura 4.4 - Identificação a branco da área de amostragem das mangueiras dedicadas da bomba de trasfega de líquidos para determinação da atividade microbiológica.***





## 5 Limite Analítico, Metodologias de Amostragem e Métodos Analíticos

---

Por forma a quantificar os resíduos provenientes das amostragens de validação de limpeza, é necessário garantir que os métodos de análise selecionados são adequados para o efeito pretendido, sendo assim necessário proceder à validação destes métodos. No entanto, para isto ser possível deve estabelecer-se primeiramente tanto as metodologias de amostragem a efetuar como os limites aceitáveis de resíduos de SA nos equipamentos.

### 5.1 Metodologias de Amostragem

A recolha de amostras da superfície de um equipamento após produção e higienização permite avaliar a eficiência dos procedimentos de limpeza estabelecidos. No entanto, a recolha de amostras deve ser efetuada em locais estratégicos aos quais se associe maior dificuldade de remoção de resíduos do produto que esteve anteriormente em produção.

De acordo com as características do equipamento, como o formato, a possibilidade de este ser desmontado e a acessibilidade aos locais de amostragem, estabelecem-se as metodologias de recolha de amostras [3,11,13,19].

#### a) Método de Amostragem com Swab

Este método de amostragem consiste na saturação de um *swab* com um volume de solvente previamente estabelecido, para que ao ser esfregado firmemente na superfície do equipamento seja possível recolher os resíduos que nesta possam estar presentes. Os resíduos recuperados serão posteriormente removidos do *swab* por meio de processos de dissolução.

#### b) Métodos de Amostragem com Solvente

O método de amostragem com solvente é particularmente utilizado em equipamentos de grandes dimensões, possibilitando a recolha de resíduos ao fazer contatar um volume de solvente previamente definido com a superfície do equipamento.

#### c) Métodos de Amostragem com Soluções de Lavagem

A recolha de amostras é efetuada em períodos específicos durante o decorrer do procedimento de limpeza e após terminado, utilizando apenas as soluções preparadas para a lavagem do equipamento.

d) Método de Amostragem por Placebo

Este método de amostragem consiste na produção de um lote de placebo com características semelhantes ao produto que será produzido posteriormente, por forma a procurar resíduos de SA resultantes da produção anterior ao procedimento de limpeza.

e) Método de Amostragem com Produto

O método de amostragem com produto consiste na produção de um lote de produto que será posteriormente analisado para procura resíduos resultantes da produção de um produto anterior ao procedimento de limpeza.

f) Método de Amostragem com Placas

A recolha de amostras é efetuada pela colocação placas no interior do equipamento por forma a estarem em contacto com produto durante a fase de produção, e posteriormente expostas ao mesmo procedimento de limpeza a que se submete o equipamento. Estas placas devem ser do mesmo material que o equipamento.

g) Método de Amostragem Direta

O método de amostragem direta consiste na avaliação do estado de limpeza da superfície sem ser realmente necessário contactar com a superfície. Este tipo de amostragem requer a utilização de sondas.

Tendo em conta os métodos apresentados anteriormente e os equipamentos para os quais se pretende validar os procedimentos de limpeza, nesta fase já é possível identificar quais os métodos mais apropriados às superfícies e aos locais onde se pretende efetuar recolha de amostras. Uma das metodologias a aplicar na recolha de amostras é método de amostragem com *swab*. Ainda que os resultados de recuperação de resíduos deste método sejam dependentes da técnica aplicada pelo operador durante o processo de recolha amostras, é um método bastante económico e facilmente adaptável a uma grande variedade de superfícies. Permite a amostragem de locais específicos, apenas por meios físicos e de dissolução.

Para equipamentos de grandes dimensões onde não há a possibilidade de desmontar o equipamento para efetuar o procedimento de limpeza e consequentemente apresentam acessibilidade reduzida aos pontos-críticos de análise, ou equipamentos com possibilidade de desmontagem mas as principais peças onde se verifica contato superfície-produto são agulhas ou mangueiras, recorre-se ao método de amostragem com solvente.

Este método permite amostrar uma maior área superficial fazendo com que as amostras recolhidas através desta metodologia sejam mais representativas quando comparadas com amostras recolhidas por outros métodos aplicados aos mesmos equipamentos. Permite ainda, uma menor perda na recuperação de resíduos uma vez que o método de amostragem é menos dependente de técnica.

A metodologia de recolha de amostras a aplicar em cada um dos equipamentos para os quais se pretende validar os procedimentos de limpeza, encontra-se marcada com X na tabela 5.1.

**Tabela 5.1 – Metodologia de recolha de amostras para resíduo de SA a aplicar em cada equipamento.**

Equipamentos	Amostragem com Swab	Amostragem com Solvente de Lavagem
Gerais		
Câmara de Pesagem	X	NA
Reservatório 250L (nº4)	X	NA
Reservatório 100L (nº3)	X	NA
Formas Líquidas		
Reator 2000L	NA	X
Agitador de Hélice	X	NA
Máquina de Enchimento de Líquidos (nº1)	NA	X
Formas Pastosas		
Homogeneizador	X	NA
Máquina de Enchimento de Pomadas	X	NA

## 5.2 Determinação do Limite Analítico (LA)

Após ter sido efetuado o procedimento de limpeza de um equipamento, caso se verifique a passagem de contaminações para o lote seguinte, deve determinar-se um limite por forma a garantir que estas se encontram em quantidades aceitáveis [20].

Este limite deve ser prático, verificável e alcançável. No sentido em que deve ser adequado à validação que se pretende efetuar, determinado por uma técnica analítica e que o método analítico selecionado consegue satisfazer o limite estabelecido [13].

### Limite de Resíduo Aceitável (LRA)

O limite de resíduo aceitável entende-se pela quantidade residual admitida de substância ativa A num produto B.

- Com base na dose de resíduo

Sendo a utilização das substâncias ativas em questão bem conhecida e caracterizada, o limite de resíduo aceitável deve ser determinado com base em dados terapêuticos, especificamente a mínima dose diária (mDd) da substância ativa presente no produto pior-caso A e a máxima dose diária (MDd) do produto B.

Deverá ser também aplicado um fator de segurança (FS), sendo este valor dependente da forma farmacêutica em questão.

**Tabela 5.2 – Fatores de segurança para diversas formas farmacêuticas [13].**

Fator de Segurança (FS)
0,01 para formas tópicas
0,001 para formas orais (0,1%)
0,0001 para injetáveis ou para forma oftálmicas e produtos em investigação

Assim, para a limpeza de um determinado equipamento onde terá sido produzido um certo produto contendo substância ativa A e que será utilizado posteriormente para a produção de um produto B, o LRA pode ser calculado de acordo com a seguinte equação:

$$LRA (\mu g/g) = FS \times \frac{mDd \text{ de } A}{MDd \text{ de } B} \quad \text{Equação 5.1}$$

Após a determinação do LRA, caso o valor obtido se verifique superior a 10µg/g (ppm) deverá ser este o valor a utilizar para a continuidade do trabalho de validação de limpeza pretendido.

- Com base na toxicidade do resíduo [13,21]

O limite de resíduo aceitável poder ser calculado entrando em conta com o consumo aceitável diário (ADI), representando este o efeito tóxico da substância no corpo.

Esta abordagem deve aplicar-se a:

- a) Substâncias em que as doses terapêuticas não estão estabelecidas;
- b) Medicamentos novos;
- c) Medicamentos em fase de investigação;
- d) Excipientes;
- e) Agentes de limpeza;
- f) Resíduos sem dose como produtos de degradação (intermédios).

O efeito tóxico de uma determinada substância no corpo humano pode ser estimado de duas formas:

1) Substâncias com poucos dados de toxicidade

Para a determinação do ADI utiliza-se o conceito de dose letal (LD<sub>50</sub>), sendo este relativo à dose (em mg/Kg) necessária para se verificar a morte de 50% da população animal em teste.

$$ADI (mg/dia) = LD50 (mg/Kg) \times P(Kg) \times F \quad \text{Equação 5.2}$$

Onde P é o peso do corpo humano (utilizando-se valores de 50 ou 60Kg), e F que é um fator entre o fator de segurança (FS) e o fator de conversão entre espécies determinando empiricamente.

2) Substâncias em que se conhece o valor do nível de efeito não observado (NOEL)

$$ADI (mg/dia) = NOEL (mg/Kg) \times P(Kg) \times FS \quad \textbf{Equação 5.3}$$

Onde P é o peso do corpo humano (utilizando-se valores de 50 ou 60Kg), e FS o fator de segurança (FS) dependente da via de administração.

Assim, pode ser então determinado o LRA por aplicação da seguinte equação:

$$LRA (\mu g/g) = \frac{ADI \text{ de A}}{MDd \text{ de B}} \quad \textbf{Equação 5.4}$$

À semelhança do que terá sido anteriormente referido para o cálculo de resíduo aceitável com base na dose de resíduo, caso o valor obtido se verifique superior a 10µg/g (ppm) deverá ser este o valor a utilizar para a continuidade do trabalho de validação de limpeza pretendido.

#### → Cálculos do LRA para os equipamentos em validação

##### **Câmara de Pesagem**

mDd de A = 15mL x 0,74mg/mL = 11,1mg

MDd de B = 1g creme

FS = 0,001 (fator de segurança para formas orais)

$$LRA \left( \frac{\mu g}{g} \right) = FS \times \frac{mDd \text{ de A}}{MDd \text{ de B}} = 0,001 \times \frac{11,1 \times 1000 (\mu g)}{1 (g)} = 11,1 \mu g/g$$

Como o resultado obtido é superior a 10µg/g, o valor de LRA a utilizar para continuação dos cálculos é de 10µg/g.

##### **Reservatório 250L (nº4)**

mDd de A = 15mL x 0,74mg/mL = 11,1mg

MDd de B = 2 x (3 x 8µL) = 0,048mL = 0,048g

FS = 0,001 (fator de segurança para formas orais)

$$LRA \left( \frac{\mu g}{g} \right) = FS \times \frac{mDd \text{ de A}}{MDd \text{ de B}} = 0,001 \times \frac{11,1 \times 1000 (\mu g)}{0,048 (g)} = 231,25 \mu g/g$$

Como o resultado obtido é superior a 10µg/g, o valor de LRA a utilizar para continuação dos cálculos é de 10µg/g.

### **Reservatório 100L (nº3)**

mDd de A = 0,5g creme x 1mg/g creme = 0,5mg

MDd de B = 2 x (3 x 8µL) = 0,048mL = 0,048g

FS = 0,01 (fator de segurança para formas tópicas)

$$LRA \left( \frac{\mu g}{g} \right) = FS \times \frac{mDd \text{ de } A}{MDd \text{ de } B} = 0,01 \times \frac{0,5 \times 1000 (\mu g)}{0,048 (g)} = 104,17 \mu g/g$$

Como o resultado obtido é superior a 10µg/g, o valor de LRA a utilizar para continuação dos cálculos é de 10µg/g.

### **Reator 2000L**

mDd de A = 15mL x 0,74mg/mL = 11,1mg

MDd de B = 10mL x 3 = 30mL = 30 000mg

FS = 0,001 (fator de segurança para formas orais)

$$LRA \left( \frac{\mu g}{g} \right) = FS \times \frac{mDd \text{ de } A}{MDd \text{ de } B} = 0,001 \times \frac{11,1 \times 1000 (\mu g)}{30 (g)} = 0,37 \mu g/g$$

Como o resultado obtido é superior a 10µg/g, o valor de LRA a utilizar para continuação dos cálculos é de 10µg/g.

### **Aagitador de Hélice**

mDd de A = 5mL x 1mg/mL = 5mg

MDd de B = 2 x (3 x 8µL) = 0,048mL = 0,048g

FS = 0,01 (fator de segurança para formas tópicas)

$$LRA \left( \frac{\mu g}{g} \right) = FS \times \frac{mDd \text{ de } A}{MDd \text{ de } B} = 0,01 \times \frac{5 \times 1000 (\mu g)}{0,048 g} = 1041,67 \mu g/g$$

Como o resultado obtido é superior a 10µg/g, o valor de LRA a utilizar para continuação dos cálculos é de 10µg/g.

### **Máquina de Enchimento de Líquidos (nº1)**

mDd de A = 15mL x 0,74mg/mL = 11,1mg

MDd de B = 100mL = 100 000mg

FS = 0,001 (fator de segurança para formas orais)

$$LRA \left( \frac{\mu g}{g} \right) = FS \times \frac{mDd \text{ de } A}{MDd \text{ de } B} = 0,001 \times \frac{11,1 \times 1000 (\mu g)}{100 (g)} = 0,11 \mu g/g$$

Como o resultado obtido é inferior a 10µg/g, o valor de LRA a utilizar para continuação dos cálculos é de 0,11µg/g.

### **Homogeneizador e Máquina de Enchimento de Pomadas**

mDd de A = 0,5g creme x 1mg/g creme = 0,5mg

MDd de B = 1g creme

FS = 0,01 (fator de segurança para formas tópicas)

$$LRA \left( \frac{\mu g}{g} \right) = FS \times \frac{mDd \text{ de } A}{MDd \text{ de } B} = 0,01 \times \frac{0,5 \times 1000 (\mu g)}{1 (g)} = 5 \mu g/g$$

Como o resultado obtido é inferior a 10µg/g, o valor de LRA a utilizar para continuação dos cálculos é de 5µg/g.

### **Limite Residual de Superfície (LRS)**

Tratando-se de um procedimento de limpeza, é necessário determinar a quantidade admitida de resíduo na área superficial do equipamento que contacta com os produtos. Assim, o limite residual de superfície poderá ser determinado a partir da seguinte equação:

$$LRS = LRA \times \frac{TL}{SCEP} \quad \textbf{Equação 5.5}$$

Onde SCEP é a área da superfície de contato do equipamento com o produto, e TL é o tamanho do lote relativo ao produto pior-caso B, assumindo que toda a superfície está contaminada uniformemente.

Na tabela 5.3, para cada equipamento são apresentados os valores dos parâmetros necessários para aplicação da equação 5.5. bem como os valores de LRS obtidos.

**Tabela 5.3 – Determinação do limite residual de superfície.**

Limite Residual de Superfície (LRS)				
Equipamentos	LRA (µg/g)	SCEP (cm²)	TL (g)	LRS (µg/cm²)
Câmara de Pesagem	10,00	183805,00	99 000,00	5,39
Reservatório 250L (nº4)	10,00	24425,19	100 000,00	40,94
Reservatório 100L (nº3)	10,00	14677,54	100 000,00	68,13
Reator 2000L	0,37	107992,25	2000 000,00	6,85
Agitador de Hélice	10,00	767,08	100 000,00	1303,64
Máquina de Enchimento de Líquidos (nº1)	0,11	5528,24	1000 000,00	19,90
Homogeneizador	5,00	35385,07	99 000,00	13,99
Máquina de Enchimento de Pomadas	5,00	9283,09	99 000,00	53,32

### **Limite Analítico (LA)**

- Amostragem com *Swab*

Para amostragem com *swab*, o limite analítico deverá ser determinado tendo em conta a área da superfície que será amostrada (ASA), o volume de solvente (VS) a utilizar para extração de resíduos de SA recolhidos pelo *swab* e um fator de recuperação (FR), relativo à extração de resíduos de SA do *swab* com um solvente previamente determinado [11,13].

$$LA (\mu g/mL) = LRS \times ASA \times \frac{FR}{VS} \quad \text{Equação 5.6}$$

Na tabela 5.4, para cada equipamento são apresentados os valores dos parâmetros necessários para aplicação da equação 5.6. bem como os valores de LA obtidos.

**Tabela 5.4 – Determinação do limite analítico - Amostragem com *Swab*.**

Limite Analítico (LA)					
Equipamentos	LRS (µg/cm²)	ASL (cm²)	FR	VL (mL)	LA (µg/mL)
Câmara de Pesagem	5,39	100,00	1,00	50,00	<b>10,77</b>
Reservatório 250L (nº4)	40,94	100,00	1,00	50,00	81,88
Reservatório 100L (nº3)	68,13	100,00	1,00	50,00	136,26
Agitador de Hélice	1303,64	100,00	1,00	50,00	2607,29
Homogeneizador	13,99	100,00	1,00	50,00	<b>27,98</b>
Máquina de Enchimento de Pomadas	53,32	100,00	1,00	50,00	106,65

- Amostragem com Solvente

Relativamente à amostragem com solvente, o limite analítico será determinado de forma muito semelhante ao que terá sido apresentado anteriormente para a amostragem com *swab*. No entanto,



para a amostragem com solvente ter-se-á em conta a área de superfície lavada (ASL) e o volume total de solvente de lavagem (VL) utilizado na amostragem [11,13].

$$LA (\mu g/mL) = LRS \times ASL \times \frac{FR}{VL} \quad \text{Equação 5.7}$$

Na tabela 5.5, para cada equipamento são apresentados os valores dos parâmetros necessários para aplicação da equação 5.7. bem como os valores de LA obtidos.

**Tabela 5.5 – Determinação do limite analítico - Amostragem com Solvente.**

Limite Analítico (LA)					
Equipamentos	LRS ( $\mu g/cm^2$ )	ASA ( $cm^2$ )	FR	VS (mL)	LA ( $\mu g/mL$ )
Reator 2000L	6,85	4213,50	1,00	1000,00	28,87
Máquina de Enchimento de Líquidos (nº1)	19,90	921,37	1,00	1000,00	18,33

Após a determinação dos limites analíticos para os diversos equipamentos, é então necessário determinar quais os limites a utilizar nos procedimentos de validação tanto de limpeza como do método analítico.

Na tabela 3.24, anteriormente apresentada no capítulo 3, identificaram-se três produtos pior-caso A. No entanto, nesta fase do estudo será nas respetivas substâncias ativas que se focará maior atenção. Verifica-se que tanto o produto 5 como o produto 11 apresentam a mesma substância ativa, SA 7, o que permite assim, separar os equipamentos em dois grupos: Equipamentos em que o produto pior-caso A contém SA 7 e Equipamentos em que o produto pior-caso A contém SA 10.

Para cada um dos grupos independentemente do método de amostragem utilizado em cada equipamento será então determinado um limite, tendo em atenção que quanto maior for o limite maior a quantidade de resíduos de SA que será permitido no equipamento. Assim, de acordo com os valores apresentados nas tabelas 5.4 e 5.5 deve então escolher-se para cada agrupamento o menor valor de limite.

Na tabela 5.6 podem consultar-se os limites analíticos estabelecidos de acordo com os agrupamentos de SA estabelecidos.

**Tabela 5.6 – Limites analíticos selecionados por agrupamento de SA.**

Limite Analítico (LA)	
Equipamentos em que o produto pior-caso A contém SA 10	
Câmara de Pesagem	10 µg/mL
Reator 2000L	
Reservatório 250L (nº4)	
Máquina de Enchimento de Líquidos (nº1)	
Equipamentos em que o produto pior-caso A contém SA 7	
Reservatório 100L (nº3)	27 µg/mL
Agitador de Hélice	
Homogeneizador	
Máquina de Enchimento de Pomadas	

Posteriormente à validação dos métodos analíticos para quantificação de cada uma das SA's, onde se determinará um fator de recuperação relativo a cada um dos métodos de amostragem utilizados, será então necessário recalcular estes limites por forma a estabelecer os limites aceitáveis para presença de resíduos de SA nos equipamentos nos envolvidos nos procedimentos de validação de limpeza.

### 5.3 Métodos Analíticos

A seleção de um método de análise está dependente da sua capacidade para detetar e quantificar determinados resíduos. Pretende-se que este método seja prático e capaz de detetar consistentemente uma determinada substância numa amostra, sendo assim importante validar o método de análise que se pretende utilizar antes de se dar início aos estudos de validação de limpeza [17].

Pode fazer-se distinção entre dois tipos de métodos analíticos:

- Métodos específicos;
- Métodos não-específicos.

Os métodos analíticos não-específicos detetam uma grande variedade de resíduos enquanto os métodos específicos permitem detetar uma substância específica. Na tabela 5.7 apresentam-se alguns exemplos destes métodos [10,13,17].

**Tabela 5.7 – Métodos analíticos específicos e não-específicos.**

<b>Métodos de Teste Específicos</b>	<b>Métodos de Teste Não-Específicos</b>
Espetrofotometria Próxima do Infravermelho (NIR)	Carbono Orgânico Total (TOC)
Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)	pH
Espetrofotometria a Meio do Infravermelho (MIR)	Gravimetria
Absorção Atômica	Condutividade
Eletroforese Capilar	Titulação
Ensaio de Enzimas Imunossorventes (ELISA)	-

De acordo com as características do resíduo que se pretende analisar e da especificidade que se pretende associar à análise de amostras em questão, serão então determinados os métodos de teste a utilizar. Em validação de limpeza recorre-se habitualmente tanto à utilização de métodos específicos como não-específicos para identificação de resíduos.

Como se pretende identificar e quantificar a presença de resíduos de SA por forma a garantir que a sua presença não ultrapassa um limite pré-definido, é importante selecionar um método específico de teste. Nos estudos de validação de limpeza a desenvolver, o método de teste a utilizar será a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) por apresentar uma natureza altamente específica, boa sensibilidade para detetar resíduos, boa reprodutividade dos resultados e não se

verificar a existência de interferências na análise associadas à utilização de solventes orgânicos para recolha de amostras.

Relativamente à análise para quantificação de resíduos provenientes de agentes de limpeza, será utilizado o método de análise TOC, baseado na oxidação de carbonos presentes numa amostra seguida por medição do dióxido de carbono produzido. Não sendo um método específico, não há forma de garantir que a totalidade da contagem de carbono orgânico resultante da análise de amostras seja apenas relativa à utilização de agentes de limpeza. No entanto, neste tipo de análise assume-se um pior caso, isto é, a presença de carbono orgânico na amostra será apenas proveniente do agente de limpeza.

### 5.3.1 Parâmetros de Validação Analítica

- **Linearidade e Gama**

A linearidade de um procedimento analítico entende-se pela capacidade do método para obter respostas proporcionais à concentração de analito numa determinada amostra. Este parâmetro é estudado numa gama variável entre o menor (LA 50%) e maior (LA 200%) valor concentrações de analito presentes numa amostra, sendo necessário testar no mínimo cinco concentrações dentro da gama estabelecida [22,23].

Por forma demonstrar a adequabilidade do método analítico selecionado além da linearidade deve também estudar-se para a gama de concentrações estabelecidas os parâmetros relativos à precisão e exatidão [22,23].

- **Limite de Quantificação (LQ)**

O limite de quantificação entende-se pela concentração mais baixa de analito numa determinada amostra que o método permite quantificar com um grau de exatidão e precisão adequados, nas condições de trabalho estabelecidas [22,23].

A metodologia de determinação deste limite é variável consoante o método de análise selecionado é considerado ou não instrumental.

Relativamente aos métodos não instrumentais, a análise de amostras a concentrações conhecidas do analito permite determinar um nível mínimo a partir do qual o analito é quantificável com um grau de exatidão e precisão adequados [22,23].

Já para métodos instrumentais, o limite de quantificação pode ser determinado de acordo com as seguintes abordagens [22,23]:

#### Baseada na razão sinal/ruído

Pode determinar-se uma razão sinal/ruído por comparação de sinais provenientes de uma amostra com baixa concentração de analito com um branco, por forma a estabelecer-se a concentração mínima a partir da qual pode ser detetado o analito de forma confiável. Uma razão sinal/ruído 10:1 é considerada aceitável como estimativa do limite de quantificação.

Esta abordagem é apenas aplicável a procedimentos que apresentem uma linha base de ruído.

#### Baseada na curva de calibração do analito

O limite de quantificação pode ser calculado a partir da seguinte equação:

$$LQ = \frac{10\sigma}{S} \quad \text{Equação 5.8}$$

Onde  $\sigma$  é desvio padrão da regressão e S o declive da curva de calibração do analito, obtidos após o estudo efetuado para a linearidade do método.

Independentemente do método estabelecido para determinação do LQ, deve ser efetuada a confirmação deste valor através da análise de 6 soluções do analito encontrando-se estas à concentração do limite de quantificação.

- **Limite de Detecção (LD)**

O limite de deteção entende-se pela concentração mais baixa de analito numa determinada amostra que pode ser detetada mas não necessariamente quantificada como um valor exato, nas condições de trabalho [22,23].

A metodologia de determinação deste limite é variável consoante o método de análise selecionado é considerado ou não instrumental.

Relativamente aos métodos não instrumentais, a análise de amostras a concentrações conhecidas do analito permite determinar um nível mínimo a partir do qual o analito pode ser detetado de forma confiável [22,23].

Já para métodos instrumentais, o limite de deteção pode ser determinado de acordo com as seguintes abordagens [22,23]:

#### Baseada na razão sinal/ruído

Pode determinar-se uma razão sinal/ruído por comparação de sinais provenientes de uma amostra com baixa concentração de analito com um branco, por forma a estabelecer-se a concentração mínima a partir da qual pode ser detetado o analito de forma confiável. Uma razão sinal/ruído 3:1 é considerada aceitável como estimativa do limite de deteção.

Esta abordagem é apenas aplicável a procedimentos que apresentem uma linha base de ruído.

#### Baseada na curva de calibração do analito

O limite de deteção pode ser calculado a partir da seguinte equação:

$$LD = \frac{3,3\sigma}{S} \quad \text{Equação 5.9}$$

Onde  $\sigma$  é desvio padrão da regressão e S o declive da curva de calibração do analito, obtidos após o estudo efetuado para a linearidade do método.

À semelhança do que se verificou para o limite de quantificação, independentemente do método estabelecido para determinação do LD, deve ser efetuada a confirmação deste valor através

da análise de 6 soluções do analito encontrando-se estas à concentração do limite de deteção. No entanto, para métodos analíticos utilizados nos estudos de validação de limpeza, só é necessário a confirmação deste limite caso se verifique  $LA < LQ$ .

- **Seletividade**

Entende-se por seletividade a capacidade do método para detetar o analito na presença de possíveis interferentes existentes nas amostras. Alguns desses interferentes podem ser [23]:

- Brancos de swab e de recuperação da placa;
- Solventes;
- Solução contendo 10ppm do detergente e/ou de outras soluções (lixívia, álcool, etc.) utilizadas na limpeza de equipamentos;
- Excipientes (caso não tenha sido testado antes).

- **Precisão**

A precisão entende-se pelo grau de concordância entre os resultados obtidos pela aplicação sucessiva do método a múltiplas tomas de uma amostra homogénea. Este parâmetro pode ser avaliado a quatro níveis [22,23]:

- Precisão do sistema: Expressa apenas a variação introduzida pelo sistema analítico utilizado;
- Repetibilidade: Expressa a variação do método de análise num curto período de tempo, mantendo constantes todas as suas variáveis experimentais;
- Precisão Intermédia: Expressa a variação associado ao trabalho no laboratório: diferentes dias, equipamentos diferentes, diferentes analistas;
- Reprodutividade: Expressa a precisão dos resultados obtidos para um mesmo método em diferentes resultados (estudos colaborativos).

No desenvolvimento dos estudos de validação de métodos analíticos, tendo em conta que a execução dos ensaios será efetuada apenas por um analista e não se tratar de um estudo colaborativo entre laboratórios, a precisão será apenas avaliada a dois níveis: precisão do sistema e repetibilidade.

- **Exatidão/Recuperação**

Entende-se por exatidão a aproximação dos resultados obtidos pelo método analítico a um valor real ou aceite como real [22,23].

De acordo com a metodologia de amostragem estabelecida para efetuar a recolha de amostras nos estudos de validação de limpeza, deve estudar-se a exatidão do método através do cálculo de recuperação do analito. Para amostragem com solvente será avaliada a recuperação do analito da placa para o solvente (sistema de simulação da superfície do equipamento). Já para a amostragem com *swab*, a recuperação do analito será avaliada a dois níveis: recuperação do *swab* para o solvente e recuperação do método de amostragem.

A partir dos estudos de recuperação tanto do método de amostragem com swab como do método de amostragem com solvente, pode ser determinado um fator de recuperação que será aplicado para o cálculo do novo LA a utilizar nos estudos de validação de limpeza.

#### • Estabilidade

A estabilidade de uma solução entende-se pela capacidade da solução após um determinado período de tempo, para fornecer uma resposta com uma variação inferior a um valor pré-definido relativamente à resposta obtida no tempo zero. Caso isto se verifique, a solução é considerada estável nas condições em que foi efetuado o estudo [23].

No decorrer dos estudos de validação do método analítico, deve ser avaliada a estabilidade da substância ativa na solução padrão e de contaminação nas seguintes condições [23]:

- À temperatura ambiente e com exposição à luz;
- A uma temperatura entre  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  e ao abrigo da luz.

Deve ser ainda estudada a estabilidade dos resíduos de substância ativa no equipamento considerado nos estudos de validação de limpeza em condições de temperatura ambiente e com exposição à luz.

### 5.3.2 Validação de Métodos Analíticos

#### Materiais e Equipamentos

Na tabela 5.8 apresentam-se todos os materiais, reagentes e equipamentos necessários nos processos de validação.

**Tabela 5.8 – Materiais, reagentes e equipamentos utilizados no procedimento de validação.**

		Produto 11	Produto 13
Reagentes		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Água Milli-Q</li> <li>• Acetonitrilo</li> <li>• Etanol</li> <li>• Detergente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Água Milli-Q</li> <li>• Acetonitrilo</li> <li>• Metanol</li> <li>• Etanol</li> <li>• Acetona</li> <li>• Dihidrogenofosfato de potássio</li> <li>• Ácido fosfórico 85%</li> <li>• Detergente</li> </ul>
Padrão de referência		SA 7	SA 10
Materiais de Amostragem		Placas de aço-inox polido de 100cm <sup>2</sup> Swab ("large alfa swab – Tx714A Texwipe")	
Equipamentos	HPLC	Merck Hitachi Lachrom	Merck Hitachi Lachrom Agilent 1100 Series
	Balanças	Mettler Toledo AG204 e Mettler AT 250	Mettler Toledo AG204, Mettler Toledo AB204, Mettler Toledo PM4600, Mettler Toledo MS105 DU e Mettler AT 250
	Banho de ultrassons	Brandson 5210; Bandelin Sonorex RK 100	
Materiais de Laboratório	Provetas	50mL, 1000mL e 2000mL	
	Balões volumétricos	10mL, 20mL, 25mL, 50mL, 100mL, 1000mL e 2000mL	
	Pipetas e Micropipetas	Pipetas diferenciais: 2mL, 4mL, 5mL, 8mL e 10mL Micropipeta: 100-1000 $\mu\text{L}$	
	Kitasato e filtros	Kitasato 1000mL e filtros de 0,45 $\mu\text{L}$	
	Frascos para fase móvel e soluções de lavagem	150mL, 2000mL e 2500mL	

### **Condições Cromatográficas**

Por forma a garantir que os métodos analíticos a validar são capazes de detetar e identificar os analitos presentes nas amostras de validação de limpeza, é necessário estabelecer condições de trabalho de acordo com as propriedades das substâncias que se pretende identificar. Na tabela 5.9, apresentam-se as condições de trabalho estabelecidas para validação dos métodos de análise em HPLC para as SA 7 e SA 10 nos produtos 11 e 13, respetivamente.

***Tabela 5.9 – Condições de trabalho em HPLC.***

Condições	Produto 11	Produto 13
Coluna	Lichrospher C8, 250x4mm, 10µm	Lichrospher 100 RP-8, 125x4mm, 5µm
Fase Móvel	Água e Acetonitrilo (600:400)	Solução de Dihidrogenofosfato de potássio 0,02M e Acetonitrilo (600:400); com ajuste do pH da mistura a 3±0,1 com ácido fosfórico 85%
Caudal	1,2 mL/min	1,5mL/min
Volume de injeção	20 µL	20 µL
Comprimento de onda de detecção	UV a 260nm	UV a 254nm
Temperatura	Ambiente	30°C
Tempo de retenção	6-7 minutos	7-8 minutos
Tempo de corrida	12 minutos	10 minutos

### **Preparação de Soluções**

- Produto 11

#### **a) Preparação da Solução Inicial**

Pesar 27mg de padrão de SA 7 para um balão volumétrico de 100mL, adicionar 90mL solvente. Agitar até completa dissolução. Completar o volume com o mesmo solvente.

Por diluição da solução inicial podem ser preparadas soluções padrão a diferentes níveis de concentração do limite analítico (tabela 5.10).

***Tabela 5.10 – Diluições para preparação de soluções padrão (produto 11).***

Soluções Padrão			
Solução	Volume a transferir da solução inicial (mL)	Volume do balão (mL)	Concentração da solução (µg/mL)
LA 50%	5,00	100,00	13,50
LA 80%	4,00	50,00	21,60
LA	5,00	50,00	27,00
LA 160%	8,00	50,00	43,20
LA 200%	10,00	50,00	54,00

b) Preparação da solução ao Limite Quantificação (LQ)

Pesar 43,42mg de padrão de SA 7 para um balão volumétrico de 100mL e completar o volume com solvente (solução 1). Transferir 2mL da solução 1 para um balão volumétrico de 20mL e completar o volume com solvente (solução 2).

Transferir 2mL da solução 2 para um balão volumétrico de 20mL e completar o volume com solvente (concentração ao limite de detecção (LD) de 4,342 µg/ml).

c) Preparação da solução para contaminação das placas ou do swab

Pesar 168,75mg de padrão de SA 7 para balão volumétrico de 25mL, adicionar 20mL solvente. Agitar até completa dissolução. Completar o volume com o mesmo solvente.

$$\left( Q(mg) = \frac{LA \times Vi \times Vs}{Va \times 1000} = \frac{27 \times 25 \times 50}{0,2 \times 1000} = 168,75 \text{ mg} \right)$$

Sendo,

LA – Limite analítico, 27µg/mL;

Vi – Volume inicial do balão, 25mL;

Vs – Volume de solvente na amostra, 50mL;

Va - Volume de aplicação na placa ou swab ao nível do LA, 0,2mL.

- Produto 13

a) Preparação da solução de Dihidrogenofosfato de Potássio 0,02M

Pesar 2,72g de dihidrogenofosfato de potássio para um balão volumétrico de 1000mL, dissolver com 900mL de água MilliQ e agitar em seguida. Completar o volume com água Milli-Q.

b) Preparação da solução inicial

Pesar 10mg de padrão de SA 10 para balão volumétrico de 100mL, e adicionar 90mL de solvente. Agitar até completa dissolução. Completar o volume com o mesmo solvente.

Por diluição da solução inicial podem ser preparadas soluções padrão a diferentes níveis de concentração do limite analítico (tabela 5.11).

**Tabela 5.11 – Diluições para preparação de soluções padrão (produto 13).**

Soluções Padrão			
Solução	Volume a transferir da solução inicial (mL)	Volume do balão (mL)	Concentração da solução (µg/mL)
LA 50%	5,00	100,00	5,00
LA 80%	4,00	50,00	8,00
LA	5,00	50,00	10,00
LA 160%	8,00	50,00	16,00
LA 200%	10,00	50,00	20,00



c) Preparação da solução ao Limite quantificação (LQ)

Pesar 22,5mg de padrão de SA 10 para um balão volumétrico de 100mL e completar o volume com solvente (solução 1). Transferir 2mL da solução 1 para um balão volumétrico de 20mL e completar o volume com solvente (solução 2).

Transferir 2mL da solução 2 para um balão volumétrico de 20mL e completar o volume com solvente (concentração ao limite de detecção (LQ) de 2,25µg/ml).

d) Preparação da solução para contaminação das placas ou do swab

Pesar 62,5mg de padrão de SA 10 para balão volumétrico de 25mL, adicionar 20mL de solvente. Agitar até completa dissolução. Completar o volume com o mesmo solvente.

$$\left( Q(mg) = \frac{LA \times Vi \times Vs}{Va \times 1000} = \frac{10 \times 25 \times 50}{0,2 \times 1000} = 62,5 \text{ mg} \right)$$

Sendo,

LA – Limite analítico, 10µg/mL;

Vi – Volume inicial do balão, 25mL;

Vs – Volume de solvente na amostra, 50mL;

Va - Volume de aplicação na placa ou swab ao nível do LA, 0,2mL.

Por forma a simplificar e generalizar a descrição da preparação de soluções, a indicação dos solventes a utilizar para cada método pode ser consultada na tabela 5.12.

**Tabela 5.12 – Solventes utilizados na preparação de soluções e procedimentos de recolha de amostras.**

Solventes					
Produto 11			Produto 13		
Soluções	Swab	Frasco de Amostragem	Soluções	Swab	Frasco de Amostragem
Etanol 95% (V/V)			Etanol		
			Metanol		
			Etanol	Metanol	Etanol
			Etanol	Acetona	
			Etanol	Fase Móvel	
			Etanol	Acetonitrilo	
			Acetonitrilo		

Relativamente ao produto 13, sendo necessário proceder à recolha de amostras em alguns equipamentos por aplicação do método de amostragem com solvente, alterou-se o solvente de amostragem normalmente utilizado para o doseamento da SA 10 do produto 13, metanol, para um solvente que apresentasse características semelhantes e menor toxicidade.

A quantidade de solvente requerida no procedimento de na amostragem com solvente é bastante elevada, sendo necessário proceder à higienização do equipamento para remover resíduos de solvente e posteriormente recolher amostras por forma a comprovar que não são encontrados vestígios de solvente no equipamento.

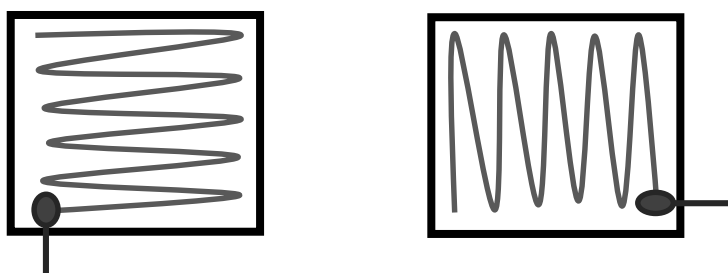
No capítulo 7, será abordado em maior detalhe os testes efetuados para identificação do solvente a utilizar na validação do método analítico para quantificação de resíduos de SA 10, bem como os resultados obtidos nos diferentes ensaios.

### **Metodologias de Amostragem**

A recolha de amostras para os parâmetros relativos à seletividade, repetibilidade do método, estabilidade do analito nas soluções analíticas e equipamento deve ser efetuada das seguintes formas:

- **Amostragem com Swab**

Adicionar 0,4mL de solvente a um *swab* (cerca de 0,2mL em cada face). A uma placa de aço-inox correspondente a 100cm<sup>2</sup>, previamente contaminada, deve esfregar-se horizontalmente uma das faces do *swab* por forma a efetuar aproximadamente 10 movimentos em zig-zag. Com a face contrária à utilizada anteriormente, volta a esfregar-se o *swab* na placa efetuando agora na vertical cerca de 10 movimentos zig-zag (Figura 5.1). Por forma a assegurar-se o contato contínuo, o *swab* deve ser firmemente pressionado de encontro à superfície.



**Figura 5.1 – Representação do método de amostragem com o swab [23].**

Colocar o *swab* num frasco de amostragem de 150mL, adicionar 50mL de solvente e fechar o frasco de amostragem. Colocar a amostra no ultrassons e manter a agitação durante 45 minutos.

- **Amostragem com Solvente**

Uma placa de aço-inox correspondente a 100cm<sup>2</sup>, previamente contaminada, é lavada com 50mL de solvente. O solvente de lavagem é recolhido para um frasco de amostragem para posterior análise.

## **Procedimentos de Validação Analítica**

A preparação de soluções e amostras será efetuada de forma semelhante para ambos os métodos em validação, no entanto os solventes a utilizar serão diferentes. Por forma a simplificar e generalizar a descrição da preparação de amostras, a indicação dos solventes a utilizar para cada método pode ser consultada na tabela 5.11.

- **Linearidade**

A linearidade do processo é estudada pela análise de soluções de concentrações a cerca de 50% (LA 50%), 80% (LA 80%), 100% (LA), 160% (LA 160%) e 200% (LA 200%) da concentração do limite analítico. A preparação destas soluções deve ser efetuada de acordo com descrição apresentada no ponto de soluções, sendo efetuadas 2 leituras a cada solução preparada.

Após a análise das soluções deve ser construída uma curva de calibração, relacionando as concentrações das soluções em análise com as áreas dos picos obtidos para cada amostra, e determinado o declive, a ordenada na origem da reta obtida e o coeficiente de correlação. Paralelamente determina-se o desvio observado entre o fator-resposta associado a cada solução e o fator-resposta associado à concentração alvo (LA).

- **Limite de Quantificação (LQ)**

Os limites de quantificação e deteção são determinados a partir da reta de calibração obtida após os estudos de linearidade. A preparação destas soluções deve ser efetuada de acordo com descrição apresentada no ponto de preparação de soluções, para posterior análise sendo efetuadas 6 leituras de cada amostra.

- **Seletividade**

A capacidade do método para detetar a substância ativa com a presença de possíveis interferentes na amostra deve ser verificada, sendo assim efetuadas duas leituras aos diferentes tipos de amostras por forma a garantir a seletividade do método.

a) Substância ativa: A preparação das soluções deve ser efetuada de acordo com a descrição anteriormente apresentada no ponto de preparação de soluções. Deve analisar-se cada uma das soluções padrão LA 50%, LA e LA 200%.

b) Solvente utilizado na preparação das amostras: Deve comparar-se a resposta obtida com a resposta de uma solução do analito na concentração correspondente ao LA.

c) Branco de swab: Um swab contendo 0,4mL de solvente deve ser colocado num frasco contendo 50mL de solvente, proceder a agitação durante 45 minutos e analisar em seguida. Comparar a resposta obtida com a resposta de uma solução do analito na concentração correspondente ao LA;

d) Branco de recuperação da placa: Esta solução deve ser preparada nas mesmas condições que a amostra de recuperação da placa quando sobrecarregada a placa com solvente.

a) Adicionar 0,4mL de solvente a uma placa, deixar secar e posteriormente amostrar com um *swab*. Colocar o *swab* num frasco de amostragem com 50mL de solvente, agitar a amostra durante 45 minutos e analisar em seguida. A resposta obtida deve ser comparada com a resposta de uma solução do analito na concentração correspondente ao LA.

b) Adicionar 0,4mL de solvente a uma placa, deixar secar e posteriormente lavar com 50mL de solvente. Recolher o solvente de lavagem para um frasco de amostragem e analisar em seguida. A resposta obtida deve ser comparada com a resposta de uma solução do analito na concentração correspondente ao LA (apenas para o produto 13).

e) Branco de recuperação da placa de detergente e/ou de outras soluções: Solução preparada nas mesmas condições da amostra de recuperação da placa, quando sobrecarregada a placa com uma solução de detergente e/ou de outras soluções de lavagem utilizadas, numa quantidade em que considerando a recuperação 100% a solução final possua 10ppm de concentração.

a) Preparar uma solução de concentração 10ppm de detergente (10mg de detergente para um balão volumétrico de 10mL, perfazer o volume com solvente), retirar 0,5mL desta solução e colocar na placa. Deixar secar, amostrar com um *swab* e colocá-lo num frasco com 50mL de solvente, agitar durante 45 minutos e analisar em seguida. A resposta obtida deve ser comparada com a resposta de uma solução do analito na concentração correspondente ao LA.

b) Preparar uma solução de concentração 10ppm de detergente (10mg de detergente para um balão volumétrico de 10mL, perfazer o volume com solvente), retirar 0,5mL desta solução e colocar na placa. Deixar secar e lavar com 50mL de solvente. Recolher o solvente de lavagem para um frasco de amostragem e analisar em seguida. A resposta obtida deve ser comparada com a resposta de uma solução do analito na concentração correspondente ao LA (apenas para o produto 13).

f) Solução de detergente e/ou de outras soluções de lavagem utilizadas a 10ppm: Solução preparada no solvente das amostras, a partir das soluções utilizadas na limpeza do equipamento considerando sua pureza de 100%.

a) Em caso de utilização de várias soluções de lavagem pode ser avaliada em soluções individuais ou em conjunto: Da solução anterior de concentração 10ppm de detergente retirar 0,1mL para balão volumétrico de 10mL e completar com solvente. Analisar a solução e comparar a resposta obtida com a resposta de uma solução do analito na concentração correspondente ao LA.

b) Solução de detergente e/ou de outras soluções de lavagem utilizadas a 10ppm contendo o analito na concentração correspondente ao LA 50%: Retirar 0,1mL da solução anterior (ponto f, alínea a) e colocar num balão volumétrico de 10mL. Perfazer o volume com a solução de concentração padrão LA 50%.

g) Amostra de recuperação do swab: Adicionar a um *swab* 0,2mL da solução de contaminação. Colocar o swab num frasco de amostragem com 50mL de solvente, agitar a amostra durante 45 minutos e analisar em seguida. A resposta obtida deve ser comparada com a resposta de uma solução do analito na concentração correspondente ao LA.

h) Amostra de recuperação da placa:

a) Adicionar 0,2mL da solução de contaminação a uma placa, deixar secar e posteriormente amostrar com um *swab*. Colocar o swab num frasco de amostragem com 50mL de solvente, agitar a amostra durante 45 minutos e analisar em seguida. A resposta obtida deve ser comparada com a resposta de uma solução do analito na concentração correspondente ao LA.

b) Adicionar 0,2mL da solução de contaminação a uma placa, deixar secar e posteriormente lavar com 50mL de solvente. Recolher o solvente de lavagem para um frasco de amostragem e analisar em seguida. A resposta obtida deve ser comparada com a resposta de uma solução do analito na concentração correspondente ao LA (apenas para o produto 13).

- **Precisão**

A precisão será então avaliada a dois níveis:

a) Precisão do sistema: A preparação das soluções deve ser efetuada de acordo com a descrição anteriormente apresentada no ponto de preparação de soluções. Deve efetuar-se seis leituras para as soluções padrão LA 50% e LA 200%, e 10 leituras para a solução padrão LA.

b) Repetibilidade do Método: De acordo com a metodologia de amostragem de cada um dos métodos a validar, serão realizados 2 conjuntos de 6 determinações para amostragem com *swabs* e 1 conjunto de 6 determinações para a amostragem com soluções de lavagem. Tendo atenção à quantidade de analito utilizada na contaminação para que após a preparação as amostras esta seja correspondente ao LA.

a) Adicionar 0,2mL da solução de contaminação a um *swab*, colocando-o posteriormente num frasco de amostragem com 50mL de solvente. Agitar a amostra durante 45 minutos e analisar em seguida. Este procedimento deve ser efetuado para a contaminação total de 6 *swabs*.

b) Adicionar 0,2mL da solução de contaminação a uma placa, deixar secar e posteriormente amostrar com um *swab*. Colocar o swab num frasco de amostragem com 50mL de solvente, agitar a amostra durante 45 minutos e analisar em seguida. Este procedimento deve ser efetuado para a contaminação total de 6 placas.

c) Adicionar 0,2mL da solução de contaminação a uma placa, deixar secar e posteriormente lavar com 50mL de solvente. Recolher o solvente de lavagem para um frasco de amostragem e analisar em seguida. Este procedimento deve ser efetuado para a contaminação total de 6 placas (apenas para o produto 13).

- **Exatidão/Recuperação**

A preparação das soluções deve ser efetuada de acordo com a descrição anteriormente apresentada no ponto de preparação de soluções.

a) Recuperação do swab para o solvente: Adicionar 0,2mL da solução de contaminação a um *swab*, colocando-o posteriormente num frasco de amostragem com 50mL de solvente. Agitar a amostra durante 45 minutos e analisar em seguida. Este procedimento deve ser efetuado para a contaminação total de 3 *swabs*, procedendo a quantificação dos analitos presentes nas amostras face a uma solução padrão de concentração correspondente ao LA.

Contaminando agora as placas com volumes de 0,1mL e 0,4mL, repete-se o procedimento anterior por forma a quantificar os analitos presentes nas amostras face a uma solução padrão de concentração correspondente ao LA 50% e LA 200%, respetivamente.

b) Recuperação do método de amostragem: Adicionar 0,2mL da solução de contaminação a uma placa, deixar secar e posteriormente amostrar com um *swab*. Colocar o *swab* num frasco de amostragem com 50mL de solvente, agitar a amostra durante 45 minutos e analisar em seguida. Este procedimento deve ser efetuado para a contaminação total de 3 placas, procedendo a quantificação dos analitos presentes nas amostras face a uma solução padrão de concentração correspondente ao LA.

Contaminando agora as placas com volumes de 0,1mL e 0,4mL, repete-se o procedimento anterior por forma a quantificar os analitos presentes nas amostras face a uma solução padrão de concentração correspondente ao LA 50% e LA 200%, respetivamente.

c) Recuperação da placa para solvente utilizando soluções de lavagem: Adicionar 0,2mL da solução de contaminação a uma placa, deixar secar e posteriormente lavar com 50mL de solvente. Recolher o solvente de lavagem para um frasco de amostragem e analisar em seguida. Este procedimento deve ser efetuado para a contaminação total de 3 placas, procedendo a quantificação dos analitos presentes nas amostras face a uma solução padrão de concentração correspondente ao LA (apenas para o produto 13).

Contaminando agora as placas com volumes de 0,1mL e 0,4mL, repete-se o procedimento anterior por forma a quantificar os analitos presentes nas amostras face a uma solução padrão de concentração correspondente ao LA 50% e LA 200%, respetivamente.

- **Estabilidade**

a) Estabilidade das soluções Analíticas

Os estudos de estabilidade das soluções padrão e contaminação de concentração correspondente ao LA são efetuados pela determinação do teor das soluções em diferentes condições de conservação. A cada amostra serão efetuadas 2 leituras, sendo que a primeira amostra respetiva a cada uma das soluções será analisada imediatamente após a sua preparação. As duas

amostras seguintes serão analisadas após a conservação das soluções durante um período de 24 horas à temperatura ambiente com exposição à luz, e à temperatura de  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  ao abrigo da luz.

A preparação das soluções deve ser efetuada de acordo com a descrição anteriormente apresentada no ponto de preparação de soluções, em particular para a solução de contaminação as amostras para análise serão recolhidas após sobrecarga de placas de acordo com o que terá sido descrito no tópico anterior relativo à exatidão/recuperação nos pontos b) e c).

#### b) Estabilidade da substância no Equipamento

Os estudos de estabilidade da solução de contaminação de concentração correspondente ao LA são efetuados pela determinação do teor da solução imediatamente após a sua preparação, e após a conservação da placa contaminada durante um período de 24 horas à temperatura ambiente com exposição à luz.

A preparação da solução de contaminação deve ser efetuada de acordo com a descrição anteriormente apresentada no ponto de preparação de soluções. As amostras para análise serão recolhidas após sobrecarga de placas de acordo com o que terá sido descrito no tópico anterior relativo à exatidão/recuperação nos pontos b) e c).

Em suma, na tabela 5.12 pode observar-se marcado com X os parâmetros de validação para cada método e as respetivas metodologias de amostragem utilizadas.

**Tabela 5.13 – Resumo dos parâmetros em análise relativos a cada método analítico testados na validação.**

Parâmetros				Produto 11	Produto 13
Linearidade				X	X
LQ				X	X
Seletividade				X	X
Precisão	Precisão do sistema			X	X
	Repetibilidade			X	X
Exatidão	Recuperação do swab			X	X
	Recuperação do método de amostragem			X	X
	Recuperação da placa para solvente			NA	X
Estabilidade	Soluções analíticas	Solução Padrão		X	X
		Solução de contaminação	Recuperação do método de amostragem	X	X
			Recuperação da placa para solvente	NA	X
	Substância no equipamento	Solução de contaminação	Recuperação do método de amostragem	X	X
			Recuperação da placa para solvente	NA	X





## 6 Validação de Limpeza de Equipamentos

---

A validação de limpeza permite assegurar a adequabilidade dos procedimentos limpeza em vigor para cada equipamento ou grupo de equipamentos, bem como identificar e corrigir potenciais problemas previamente inesperados, por forma a garantir a qualidade, segurança e eficácia dos produtos finais [3,11].

Um dos requisitos das GMP é precisamente o desenvolvimento de estudos de validação de limpeza, por forma a prevenir possíveis contaminações. Assim, é importante identificar quais as possíveis fontes de contaminação, bem como determinar metodologias de recolha e análise de amostras.

### 6.1 Inspeção Visual

A inspeção visual é o primeiro teste a efetuar nos procedimentos de validação de limpeza, uma vez que a presença de resíduos de sujidade é suficiente para a não continuidade do processo de validação. Ainda que este teste não seja indicativo relativamente à quantidade de resíduos presentes no equipamento e se estes se encontram ou não de acordo com limites aceitáveis, é no entanto suficiente para indicação de falhas no procedimento de limpeza [24].

#### Material Utilizado

Para execução desta amostragem é apenas necessária a utilização de luvas e de uma lanterna (apenas para analisar locais de pouca visibilidade).

#### Amostragem

Durante este procedimento deve utilizar luvas. Após a limpeza do equipamento, devem ser verificados os seguintes aspetos:

- Se os componentes desmontados foram lavados e secos;
- Ausência de resíduos de pó em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos;
- Ausência de manchas em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos;
- Ausência de odores;
- A área de trabalho está limpa e arrumada;
- Ausência de escoriações mecânicas;
- Ausência de fibras, borrachas ou tecidos;
- Ausência de dedadas, restos de gordura e humidade.

Nesta análise, deve ter-se em especial atenção os pontos considerados críticos pela análise do equipamento.

### **Critério de Aceitação**

A não conformidade de algum dos parâmetros anteriormente referidos impedirá a continuação do processo de validação, sendo necessário efetuar nova limpeza ao equipamento.

### **6.2 Determinação de resíduos de Agentes de Limpeza**

Após higienização dos equipamentos utilizados na produção de um determinado medicamento, é necessário garantir que estes equipamentos não possuem vestígios de agentes de limpeza. Assim, após a inspeção visual, são efetuadas recolhas de amostras para determinação da presença destes resíduos, tendo em conta os limites de aceitação previamente estabelecidos por forma a considerar ou não aceitável as quantidades de resíduos verificadas.

Para um grupo de produtos com a mesma ITL, este teste não terá de ser necessariamente efetuado aquando a limpeza de mudança de produto após a produção do produto pior-caso A. Como se pretende apenas detetar a presença de resíduos de agentes de limpeza, o teste pode ser efetuado após a limpeza de mudança de produto de qualquer um dos produtos pertencentes ao grupo.

### **Material Utilizado**

Na tabela 6.1 apresentam-se todos os materiais, reagentes e equipamentos necessários nos para a recolha e análise de amostras.

***Tabela 6.1 - Identificação de materiais e equipamentos utilizados na recolha e análise de amostras para determinação de resíduos de agentes de limpeza.***

<b>Materiais e Equipamentos</b>
Máscara e Luvas
Recipiente de Recolha
Equipamento de TOC (Total Organic Carbon)
5L de água desmineralizada (com baixo teor em TOC)
3 Frascos para análise de TOC (Branco, Amostras A e B)
Rótulo: <ul style="list-style-type: none"><li>• Identificação da amostra: “Amostra ou branco para validação de limpeza – Resíduo de detergente”;</li><li>• Identificação do equipamento;</li><li>• Identificação do produto para que foi utilizado o equipamento;</li><li>• Identificação da Amostra ou Branco;</li><li>• Data de amostragem.</li></ul>

### **Amostragem**

Durante este procedimento deve utilizar máscara e luvas. A recolha de amostras deve ser efetuada sempre com água corrente e nunca mergulhando o frasco no recipiente de recolha. Antes de dar início à recolha de amostras, deve verificar se o recipiente de recolha está limpo.

Por forma a garantir a ausência de resíduos de detergente provenientes da limpeza do recipiente de recolha, deve passar-se o seu interior por água desmineralizada descartando a água no final. Repetir este procedimento mais 2 vezes. Enchendo em seguida o recipiente de recolha com 5L de água desmineralizada.

Deve recolher-se um branco da água desmineralizada já contida no recipiente de recolha. Lavar o interior do frasco de amostragem (figura 6.1), descartando esta água no final. Repetir este procedimento mais duas vezes, tendo em seguida o cuidado de encher o frasco até ao topo com água desmineralizada.



**Figura 6.1 – Frasco para amostragem TOC.**

Para o passo seguinte, é necessário ter em conta a estrutura do equipamento, podendo este teste ser adaptado de acordo com a área que se pretende amostrar. Assim, as peças mais pequenas devem ser mergulhadas no recipiente de recolha, enquanto para equipamentos de grandes volumes deve fazer-se passar a água numa superfície previamente definida. A recolha de amostras será semelhante à recolha efetuada para o branco. Sendo importante lavar os frascos para a recolha de amostras (A e B) 3 vezes, descartando estas águas antes da recolha das amostras finais. Os frascos devem ser cheios até ao topo.

### **Análise das amostras**

- **Calibração:** A calibração do sistema é conseguida por análise da solução padrão diluída de Sacarose 500ppb e de um branco. A curva de calibração será considerada satisfatória se os desvios da curva forem  $\leq 10$ ppb.

• Adequabilidade do sistema: A adequabilidade do sistema é determinada por análise de um branco (rw) e das soluções padrão diluídas de Sacarose 500ppb (rs) e de 1,4-Benzoquinona 500ppb (rss). A adequabilidade do sistema será satisfatória se o valor de eficiência da resposta se encontrar entre 85%-115%.

$$Eficiência\ da\ resposta = \frac{(rss - rw)}{(rs - rw)} \times 100 \quad \text{Equação 6.1}$$

• Controlo da repetibilidade do equipamento: O controlo de repetibilidade pode ser efetuado por análise de um branco (rw) e da solução padrão diluída de Sacarose 500ppb (rs). A repetibilidade do método é considerada adequada se o maior e o menor resultados obtidos para cada uma das soluções, se encontrarem dentro dos intervalos  $média_{rw} \pm 10ppb$  ou  $média_{rs} \pm 10ppb$ , respetivamente.

**Nota:** Tendo em conta a pouca utilização do equipamento, o controlo da repetibilidade deve ser efetuado semanalmente.

• Análise de amostras: Introduzir a sonda no frasco contendo a amostra e selar com parafilme. Identificar a amostra e definir o número réplicas, iniciando-se em seguida a análise. Os resultados obtidos através da análise de amostras devem ser comparados com os critérios de aceitação previamente estabelecidos.

### **Critério de Aceitação**

Para a análise de TOC é muito comum estabelecer-se por defeito um limite máximo aceitável de 10ppm (LRA). No entanto, à semelhança do que terá sido visto no capítulo anterior para a determinação do limite analítico para a presença de SA's, podem ser estabelecidos limites tendo em conta a área total do equipamento, a área da superfície amostrada e volume de solvente utilizado, por forma a obter-se um valor mais adequado.

Assim, para cada equipamento, podem ser estabelecidos limites analíticos para a presença de resíduos de agentes de limpeza, por aplicação das equações 5.5 e 5.7, e mantendo LRA de 10ppm. Deste limite, pretende-se apenas contabilizar a contribuição dos agentes de limpeza para a contagem carbono orgânico, sendo então multiplicado o valor de limite pela percentagem de carbono orgânico existente no detergente utilizado na higienização dos equipamentos (33,4%), obtendo-se assim os limites aceitáveis (consultar tabelas 6.2 e 6.3).

**Tabela 6.2 - Determinação do Limite Residual de Superfície para Agentes de Limpeza.**

<b>Determinação do Limite Residual de Superfície para Agentes de Limpeza</b>				
<b>Equipamentos</b>	<b>LRA (µg/g)</b>	<b>SCEP (cm²)</b>	<b>TL (g)</b>	<b>LRS (µg/cm²)</b>
Reservatório de 250L (nº4)	10,00	24425,19	100000,00	40,94
Reservatório de 100L (nº3)	10,00	14677,54	100000,00	68,13
Reator 2000L	10,00	107992,25	2000000,00	185,20
Reator 150L	10,00	21211,96	99000,00	46,67
Agitador de Hélice	10,00	767,08	100000,00	1303,64
Agitador de Duplo Cone	10,00	946,44	2000000,00	21131,82
Máquina de Enchimento de Líquidos (nº1)	10,00	5528,24	1000000,00	1808,89
Homogeneizador	10,00	35385,07	99000,00	27,98
Máquina de Enchimento de Pomadas	10,00	9283,09	99000,00	106,65
Bomba da Trasfega de Líquidos	10,00	3648,33	2000000,00	5481,96

**Tabela 6.3 - Determinação do Limite Analítico para Agentes de Limpeza.**

<b>Determinação do Limite Analítico para Agentes de Limpeza.</b>						
<b>Equipamentos</b>	<b>LRS (µg/g)</b>	<b>ASL (cm²)</b>	<b>FR</b>	<b>VL (mL)</b>	<b>LA (µg/mL)</b>	<b>LA (µg/mL) (contribuição do detergente)</b>
Reservatório de 250L (nº4)	40,94	1684,75	1,00	5000,00	13,80	4,60
Reservatório de 100L (nº3)	68,13	2686,81	1,00	5000,00	36,61	12,23
Reator 2000L	185,20	4213,5	1,00	5000,00	156,07	52,13
Reator 150L	46,67	1289,56	1,00	5000,00	12,04	4,02
Agitador de Hélice	1303,64	72	1,00	5000,00	18,77	6,27
Agitador de Duplo Cone	21131,82	534,89	1,00	5000,00	2260,64	755,05
Máquina de Enchimento de Líquidos (nº1)	1808,89	921,37	1,00	5000,00	333,33	111,34
Homogeneizador	27,98	1057,22	1,00	5000,00	5,92	1,97
Máquina de Enchimento de Pomadas	106,65	501,56	1,00	5000,00	10,70	3,57
Bomba da Trasfega de Líquidos	5481,96	3648,33	1,00	5000,00	4000,00	1336,00

Ainda que o objetivo da aplicação deste método de determinação de limites fosse a obtenção de valores mais adequados à área de cada um dos equipamentos, é importante analisar os valores apresentados na tabela 6.3 e compreender até que ponto estes valores serão realmente adequados para serem considerados como limite de aceitação.

Para alguns equipamentos, como é o caso do homogeneizador, o limite obtido é bastante baixo e dificilmente realizável. Enquanto para equipamentos como a bomba de trasfega de líquidos (nº1), o limite obtido é extremamente elevado e aceitar esse limite seria aceitar um grau de contaminação bastante elevado.

Assim, para equipamentos em que se verifiquem estas duas situações o limite de aceitação a utilizar será o valor teórico de 10ppm. Tendo isto em conta, na tabela 6.4 apresentam-se os limites estabelecidos para controlo da presença de resíduos de agentes de limpeza.

**Tabela 6.4 – Limite Aceitável para resíduos Agentes de Limpeza.**

<b>Limite Aceitável para resíduos Agentes de Limpeza</b>	
<b>Equipamentos</b>	<b>LA (pmm)</b>
Reservatório de 250L (nº4)	≤ 10,00
Reservatório de 100L (nº3)	≤ 12,00
Reator 2000L	≤ 52,00
Reator 150L	≤ 10,00
Agitador de Hélice	≤ 10,00
Agitador de Duplo Cone	≤ 10,00
Máquina de Enchimento de Líquidos (nº1)	≤ 10,00
Homogeneizador	≤ 10,00
Máquina de Enchimento de Pomadas	≤ 10,00
Bomba da Trásfega de Líquidos	≤ 10,00

### **6.3 Determinação da Atividade Microbiana**

Após a higienização do equipamento, a possibilidade de se verificarem condições favoráveis ao crescimento microbiológico devem ser consideradas, por forma a ser possível prevenir a contaminação microbiana superior a limites previamente estabelecidos.

As contaminações microbiológicas podem ocorrer por diversas razões, quer seja pelo armazenamento do equipamento ainda húmido ou exposição do equipamento a contaminantes externos por falta de isolamento durante o período de armazenamento [25].

No entanto, durante um certo período tempo de armazenamento, em condições ambientais controladas, é possível considerar que a limpeza o equipamento ainda se encontra válida [25].

Por forma estabelecer este período de validade, o equipamento deve ser mantido nas condições de armazenamento durante um período máximo de tempo após efetuado o procedimento de limpeza, e posteriormente proceder-se à recolha de amostras e comparação com os limites de controlo estabelecidos.

À semelhança do que terá sido anteriormente referido para determinação de resíduos de agentes de limpeza, o teste de determinação da atividade microbiológica não terá de ser necessariamente efetuado aquando a limpeza de mudança de produto após a produção do produto pior-caso A.

### **Material Utilizado**

Na tabela 6.5 apresentam-se todos os materiais, reagentes e equipamentos necessários nos para a recolha e análise de amostras.

**Tabela 6.5 - Identificação de materiais e equipamentos utilizados na recolha e análise de amostras para procura de atividade microbiológica.**

Materiais e Equipamentos		
Amostragem por <i>Zaragatoa</i>	Amostragem por Placas de Contato	Amostragem por Recolha de Águas
Estufa de incubação		
Pano estéril e álcool a 70%		
Tubos previamente preparados contendo 5mL de tampão fosfato pH7,0 e 1 zaragatoa estéril em cada, sendo estes correspondentes ao branco e as amostras.	Placas de contato de 25cm <sup>2</sup> , contendo meio de cultura TSA, esterilizadas e individualizadas.	1000mL de água desmineralizada estéril e 3 frascos de 250mL previamente esterilizados para recolha de amostras (branco, amostra A e B).
Rótulo: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Identificação da amostra: “Amostra para validação de limpeza – Atividade Microbiana”;</li> <li>• Identificação do equipamento;</li> <li>• Identificação do produto para que foi utilizado o equipamento;</li> <li>• Identificação de amostras (A, B ou Branco);</li> <li>• Data de amostragem.</li> </ul>		

### **Amostragem**

- Amostragem por *Zaragatoa*

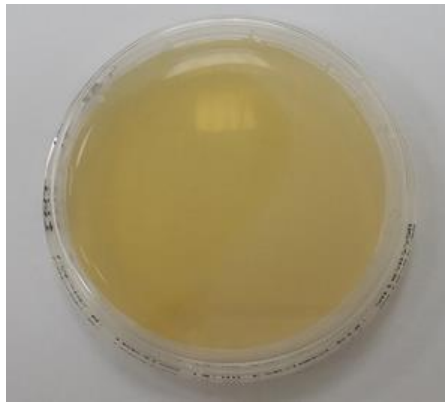
Durante este procedimento deve utilizar máscara e luvas. Antes de iniciar a amostragem devem ser previamente identificados os tubos. Retirar a zaragatoa (figura 6.2) do tubo contendo tampão fosfato pH7,0 e esfregar uma área de 25cm<sup>2</sup>. Colocar a zaragatoa no tubo e fecha-lo. Após a recolha das amostras deve limpar-se o local de análise com um pano limpo, embebido com álcool 70%.



**Figura 6.2 – Zaragatoa.**

- Amostragem por Placas de Contato

Durante este procedimento deve utilizar máscara e luvas. Antes de iniciar a amostragem devem ser previamente identificadas as placas de contato (figura 6.3). Abrir a embalagem da placa, por forma contactar o meio com a área do equipamento que se pretende amostrar durante 10 segundos. Após a recolha das amostras deve limpar-se o local de análise com um pano limpo, embebido com álcool 70%.



**Figura 6.3 – Placa de contato.**

- Amostragem por Recolha de Águas

Durante este procedimento deve utilizar máscara e luvas. Para um frasco de 250mL, recolher um branco da água desmineralizada que se irá utilizar para efetuar a amostragem no equipamento. Passar cerca de 1000mL de água desmineralizada pela área que se pretende analisar. As amostras A e B devem ser recolhidas para frascos de 250mL previamente identificados (figura 6.4), tendo-se o cuidado de os fechar após a recolha.



**Figura 6.4 – Frasco estéril para recolha de águas.**

### Análise das amostras

- Amostragem por *Zaragatoa*

Colocar a amostra na estufa durante cerca de 30 minutos a 35-37°C. O procedimento que se segue deve ser efetuado na câmara de fluxo laminar. Filtrar 5mL da amostra, lavando-se em seguida o filtro com cerca de 2x100mL de diluente fluido A (DFA). Colocar o filtro sobre uma placa contendo 15mL de tryptic soy agar (TSA). Incubar entre 20-25°C durante 5-7 dias. Após este período, a placa é colocada a incubar na estufa de 30-35°C durante 5-7 dias. Ao fim de 10-14 dias, contam-se as



unidades formadoras de colônias (UFC) por placa. Devem preparar-se os seguintes brancos para análise: Tampão pH7,0, DFA e TSA. Registrar os resultados obtidos.

- Amostragem por Placas de Contato

Colocar a placa a incubar na estufa de 20-25°C durante 5-7 dias. Após este período, a placa é colocada a incubar na estufa de 30-35°C durante 5-7 dias. Ao fim de 10-14 dias, contam-se as UFC's por placa. Registrar os resultados obtidos.

- Amostragem por Recolha de Águas

Filtrar 20mL da amostra, lavando-se em seguida o filtro com cerca de 2x100mL de DFA. Colocar o filtro sobre uma placa contendo 15mL de R2A. Incubar entre 30-35°C durante 5 dias. Repetir o procedimento anterior, por forma a efetuar um branco com DFA. Registrar os resultados obtidos.

**Nota:** O volume da amostra pode ser variável, caso necessário, podendo assim tomar-se 10mL ou 1mL das amostras.

### **Critério de Aceitação**

Os critérios de aceitação estabelecidos correspondem aos limites recomendados para áreas limpas de classe C e D, para as placas de contato (tabela 6.6) [26].

***Tabela 6.6 – Limites para a contaminação microbiana (UFC's/placa).***

<b>Classe</b>	<b>Limites de contaminação microbiana (UFC's/placa)</b>
C	≤25
D	≤50

Relativamente aos procedimentos de amostragem por recolhas de água, os limites de contaminação microbiana devem apresentar-se inferiores ao limite aceitável estabelecido para a água purificada, sendo este ≤100UFC/mL. No entanto, verificando-se na análise do branco recolhido valores superiores a 50UFC/mL, deve ser considerado um estado de alerta para a possível necessidade de serem efetuados procedimentos de sanitização ou contaminação na amostragem.

## **6.4 Determinação de resíduos de Substância Ativa**

Uma grande preocupação da indústria farmacêutica é a possibilidade de contaminação de certo produto com SA de um produto distinto (contaminação cruzada). Além de se expor um paciente

a um contaminante inesperado, a interação entre SA's pode ter efeitos preocupantes, podendo esta interação resultar num aumento da atividade do produto como pode provocar um bloqueio da sua atividade por incompatibilidade [11,12].

Neste sentido, um dos testes efetuados nos procedimentos de validação de limpeza é a procura de resíduos de SA. Este teste deve ser efetuado após a produção do produto determinado como pior-caso A, sendo posteriormente analisadas as amostras recolhidas e comparadas com um padrão ao limite de concentração LA por forma a quantificar o teor de SA na amostra.

### **Material Utilizado**

Na tabela 6.7 apresentam-se todos os materiais, reagentes e equipamentos necessários nos para a recolha e análise de amostras.

***Tabela 6.7 – Identificação de materiais e equipamentos utilizados na recolha e análise de amostras para procura de resíduos SA.***

<b>Materiais e Equipamentos</b>	
<b>Amostragem com Swab</b>	<b>Amostragem com Solvente</b>
Balança analítica	
Banho de ultrassons	
Cromatógrafo de HPLC com detetor UV	
Fracos de amostragem de 150mL, com tampa rosca	
Rótulo: • Identificação da amostra: “Amostra para validação de limpeza – Substância Ativa”; • Identificação do equipamento; • Identificação do produto para que foi utilizado o equipamento; • Identificação de amostras (A, B ou Branco).	
Solvente (Produto 11: Etanol 95% (V/V) e Produto 13: Acetonitrilo)	
Luvas descartáveis	
Swabs (large alfa swab – Tx7144A_Texwipe)	Recipiente de recolha
Micropipeta de 100-1000 µL, e as respetivas pontas	

### **Amostragem**

- **Amostragem com Swab**

Durante este procedimento deve utilizar máscara e luvas. Adicionar 0,4mL de solvente a um swab (cerca de 0,2mL em cada face). Esfregar horizontalmente uma das faces do swab por forma a efetuar aproximadamente 10 movimentos em zig-zag. Com a face contrária à utilizada anteriormente, volta a esfregar-se o swab na placa efetuando agora na vertical cerca de 10 movimentos zig-zag. Por forma a assegurar-se o contato contínuo, o swab deve ser firmemente pressionado de encontro à superfície. Colocar o swab num frasco de amostragem de 150mL previamente identificado, fechando-o em seguida. As amostras recolhidas deverão ser analisadas durante as 24 horas seguintes.

- Amostragem com Solvente

Durante este procedimento deve utilizar máscara e luvas. Passar 1000mL de solvente pela área que se pretende analisar, recolhendo posteriormente o solvente de lavagem (amostra A e B). As amostras devem ser recolhidas para um frasco de amostragem de 150mL previamente identificado, tendo-se o cuidado de fechar o frasco após a recolha. Do solvente não utilizado, deve recolher-se uma amostra correspondente ao branco. A área amostrada do equipamento deve ser posteriormente lavada com bastante água desmineralizada. As amostras recolhidas deverão ser analisadas durante as 24 horas seguintes.

### Análise das amostras

Na tabela 6.8 descrevem-se os procedimentos para análise de amostras.

**Tabela 6.8 – Procedimentos de análise de amostras de resíduos de SA.**

Procedimentos para análise amostras	
Produto 11	Produto 13
<u>Solução inicial</u> Pesar 21mg de padrão de SA 7 para um balão volumétrico de 100mL, adicionar 90mL etanol 95% (V/V). Agitar até dissolver e completar o volume com o mesmo solvente.	<u>Solução inicial</u> Pesar 9mg de padrão de SA 10 para balão volumétrico de 100mL, e adicionar 90mL de acetonitrilo. Agitar até dissolver e completar o volume com o mesmo solvente.
<u>Solução padrão</u> Para um balão volumétrico de 50mL, transferir 5mL da solução inicial e completar o volume com etanol 95% (V/V).	<u>Solução padrão</u> Para um balão volumétrico de 50mL, transferir 5mL da solução inicial e completar o volume com acetonitrilo.
<u>Solução amostra</u> Adicionar 50mL de etanol 95% (V/V) em cada frasco de amostragem, e agitar durante 45 minutos no banho de ultrassons.	<u>Solução amostra</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Amostragem com swab: Adicionar 50mL de acetonitrilo em cada frasco de amostragem, e agitar durante 45 minutos no banho de ultrassons.</li> <li>• Amostragem com solvente: Análise direta da amostra recolhida do equipamento.</li> </ul>
Condições cromatográficas e preparação das fases móveis: Consultar capítulo 5, tabela 5.8.	
As condições cromatográficas a utilizar para análise de amostras	
<u>Procedimento:</u> Com recurso ao HPLC, comparar as amostras recolhidas com a solução padrão preparada ao limite de concentração LA por forma a determinar o teor de SA da amostra em análise.	

A determinação do teor da amostra pode ser então efetuado a partir da seguinte equação:

$$T = \frac{T_p \times P \times A_a \times 1000}{V_p \times A_p} \quad \text{Equação 6.2}$$

Sendo,

T – Teor de substância ativa, em µg/mL;

$T_p$  – Toma de ensaio padrão, em mg (SA 7: 21mg e SA 10: 9mg);

$P$  – Atividade do padrão expressa em SA sob a forma de percentagem (SA 7: 0,995 (99,5%) e para SA 10: 0,997 (99,7%);

$A_a$  – Área do pico correspondente a SA no cromatograma da solução amostra;

$V_p$  – Volume total de diluição do padrão, em mL (1000mL);

$A_p$  – Área média do pico correspondente a SA nos cromatogramas da solução padrão.

### **Critério de Aceitação**

Anteriormente, determinou-se os limites analíticos para cada um dos equipamentos onde se efetua procura de SA, tendo-se em seguida encontrado os valores mais baixos por forma a estabelecer o limite a utilizar nos procedimentos de validação de métodos analíticos, para a SA 7 e SA 10 respetivamente. Após a validação de cada método, determinam-se fatores de correção, permitindo assim corrigir e estabelecer um novo limite, tendo em conta os teores de recuperação estudados. Sendo apenas apresentada a determinação deste fatores no próximo capítulo, podem consultar-se os novos limites analíticos na tabela 6.9.

***Tabela 6.9 – Critérios de aceitação relativos à presença de resíduos de SA.***

Critérios de Aceitação	
Produto 11	Produto 13
$LA \leq 21\mu\text{g/mL}$	$LA \leq 9\mu\text{g/mL}$

## 7 Análise e Discussão de Resultados

### 7.1 Validação de Métodos Analíticos

#### 7.1.1 Validação do Método de Quantificação de SA 7

- **Linearidade**

Na tabela 7.1 apresentam-se os resultados obtidos nos ensaios de teste da linearidade do método de análise.

**Tabela 7.1 - Dados relativos à linearidade obtidos para a validação do método analítico - SA 7.**

Diluição	C (µg/mL)	Área Média (µV*s)	Área Corrigida (µV*s)	Cc (µg/mL)	Viés	Fatores Resposta	Desvio (%)
D1	13,43	329110,00	328849,04	13,44	0,08	24501,02	1,85
D2	21,49	524229,50	527968,90	21,34	-0,70	24391,84	1,39
D3	26,87	646280,00	660715,48	26,28	-2,17	24056,58	0,00
D4	42,98	1105283,50	1058955,21	44,86	4,36	25713,84	6,89
D5	53,73	1296034,00	1324448,37	52,58	-2,14	24121,24	0,27
				Média	-0,12	24556,90	2,08
				DP	-	672,49	-
				CV		2,74	

Onde C representa a concentração final da solução (µg/mL), Cc a concentração corrigida da solução final (µg/mL), DP o desvio padrão e CV o coeficiente de variação. Os restantes parâmetros podem calcular-se a partir das seguintes equações:

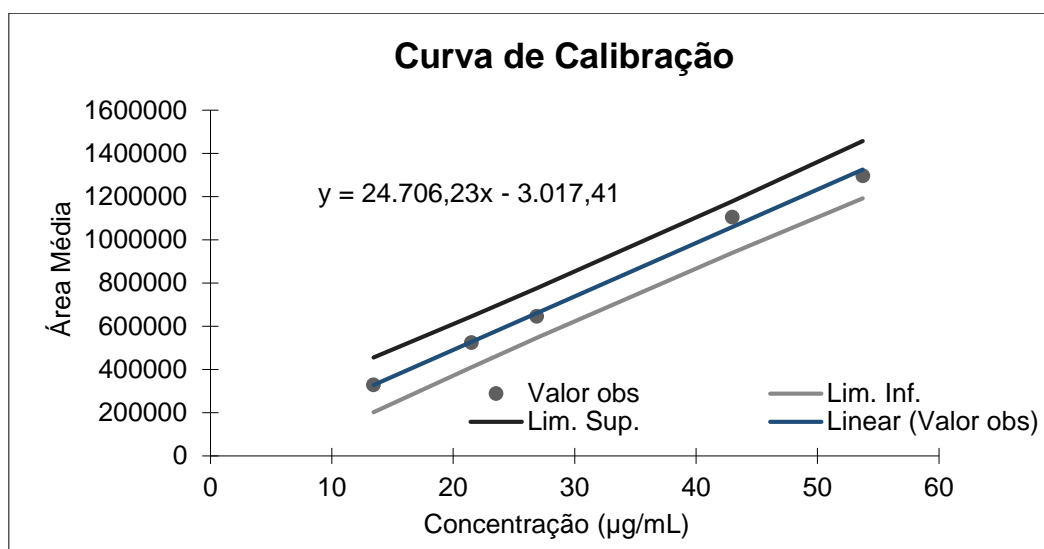
$$Viés = \frac{(Cc - C)}{C} \times 100 \quad \text{Equação 7.1}$$

$$Fator\ resposta = \frac{Áreas}{C} \quad \text{Equação 7.2}$$

$$Desvio = \frac{(factor\ resposta - factor\ resposta\ alvo)}{factor\ resposta\ alvo} \times 100 \quad \text{Equação 7.3}$$

A gama de trabalho na qual se pretende verificar a linearidade do método analítico será então entre 13,43µg/mL e 53,73µg/mL. A diluição D3 corresponde à concentração alvo.

A curva de calibração será então a representação dos pontos de área média obtidos após a análise de soluções em função da concentração de SA na amostra (figura 7.1).



**Figura 7.1 - Curva de calibração para a validação do método analítico - SA 7.**

Por observação da figura 7.1, pode verificar-se que a curva de calibração apresenta um bom ajuste aos pontos em análise. No entanto, o parâmetro que permite aceitar esta curva de calibração como representativa para a gama em análise, será o coeficiente de correlação linear sempre que o valor obtido para este coeficiente se apresente  $\geq 0,99$ .

Este coeficiente pode ser determinado através de uma estatística de regressão, tendo sido obtido para o decorrente estudo o valor de 0,998, apresentando-se de acordo com o critério de aceitação.

Pode determinar-se os limites de quantificação e de deteção com base na curva de calibração, por aplicação das equações 5.8 e 5.9, tendo-se obtido os limites apresentados na tabela 7.2.

**Tabela 7.2 – Limite de quantificação e limite de deteção – SA 7.**

Limite de Quantificação	Limite de Deteção
13,17µg/mL	4,34µg/mL

- Limite de Quantificação (LQ)**

Verificando-se uma proximidade entre o limite inferior da gama do trabalho (LA 50%) e o limite de quantificação determinado, e tendo-se efetuado estudos relativos à precisão para soluções ao nível de LA 50%, não será efetuada a confirmação do valor do limite de quantificação determinado.

No entanto, foi efetuada a confirmação do valor do limite de deteção. Caso seja possível quantificar o analito presente na solução ao nível de LD, este limite será então o novo limite de quantificação do método.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 7.3, tendo-se verificado a capacidade do método para quantificar o analito em solução, este limite será então considerado o novo limite de quantificação do método. Assim, ao nível de concentração em estudo verifica-se que o método apresenta um grau de precisão adequado, tendo sido obtido um coeficiente de variação de 0,67%, inferior ao critério de aceitação ( $CV \leq 15\%$ ).

**Tabela 7.3 – Confirmação do limite de quantificação – SA 7.**

Leitura	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área Média ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área Máxima ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )
1	96274,00	95291,00	96274,00
2	95733,00	<b>Área Mínima (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>)</b>	<b>DP</b>
3	94843,00	94499,00	634,20
4	94499,00	<b>CV (%)</b>	0,67
5	95245,00		
6	95152,00		

- Precisão**

Relativamente à precisão do sistema, de acordo com os resultados apresentados na tabela 7.4, tendo-se verificado para a concentração ao nível de LA 50%  $\text{CV} \leq 15\%$  e para as concentrações ao nível de LA e LA 200%  $\text{CV} \leq 10\%$  pode então concluir-se, que este parâmetro cumpre os critérios de aceitação estabelecidos.

**Tabela 7.4 – Análise da precisão do sistema – SA 7.**

Leitura	LA 50%	LA	LA 200%
	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )
1	341520,00	622827,00	1283682,00
2	346042,00	635890,00	1268021,00
3	347215,00	631177,00	1282611,00
4	347508,00	635643,00	1287261,00
5	348676,00	633623,00	1291153,00
6	347021,00	633275,00	1292785,00
7	-	627530,00	-
8		631547,00	
9		634202,00	
10		636080,00	
<b>Área Média <math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math> ()</b>	346330,33	632179,40	1284252,17
<b>Área Máxima (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>)</b>	348676,00	636080,00	1292785,00
<b>Área Mínima (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>)</b>	341520,00	622827,00	1268021,00
<b>DP</b>	2504,84	4201,11	8898,91
<b>CV (%)</b>	0,72	0,66	0,69

No que diz respeito à repetibilidade do método, de acordo com os resultados apresentados na tabela 7.5, os estudos de recuperação efetuados apresentam  $\text{CV} \leq 15\%$ , cumprindo o critério de aceitação estabelecido.

**Tabela 7.5 - Análise da repetibilidade – SA 7.**

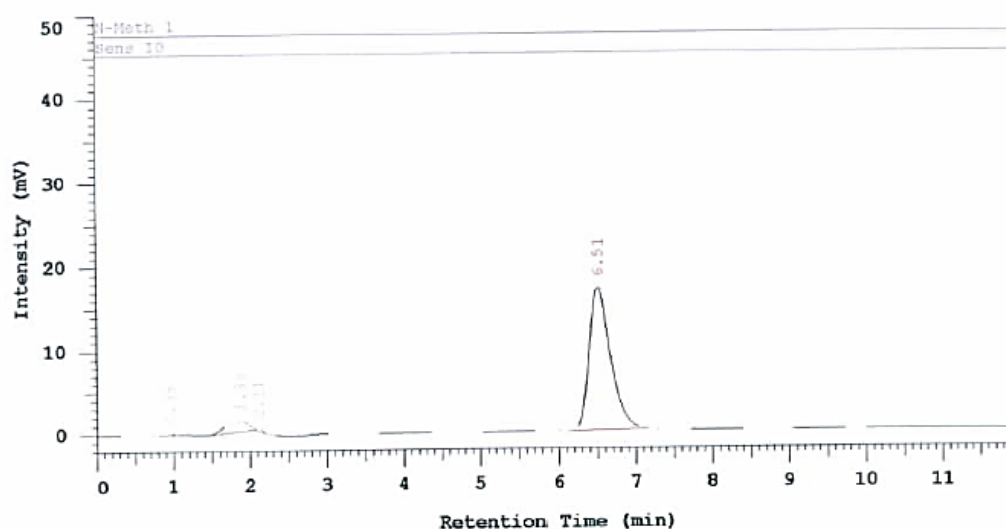
Amostras	Recuperação do Swab para solvente		Recuperação do Método de Amostragem	
	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Teor (%)	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Teor (%)
LA				
Padrão (inj1)	650686,00	-	653571,00	-
Padrão (inj2)	657739,00		650424,00	
1	636291,00	97,23	492752,00	75,55
2	655436,00	100,16	494610,00	75,84
3	641220,00	97,98	461433,00	70,75
4	613546,00	93,76	546899,00	83,86
5	639689,00	97,75	445700,00	68,34
6	657089,00	100,41	543310,00	83,31
<b>Média</b>	-	97,88	-	76,27
<b>Máximo</b>		100,41		83,86
<b>Mínimo</b>		93,76		68,34
<b>DP</b>		2,41		6,34
<b>CV (%)</b>		2,46		8,31

- **Seletividade**

Os resultados obtidos relativamente à capacidade do método para deteção de substância ativa na presença de possíveis interferentes são apresentados da figura 7.2 até à figura 7.12. Por não ser muito visível, efetuou-se uma marcação circular em torno dos picos relativos ao solvente utilizado.

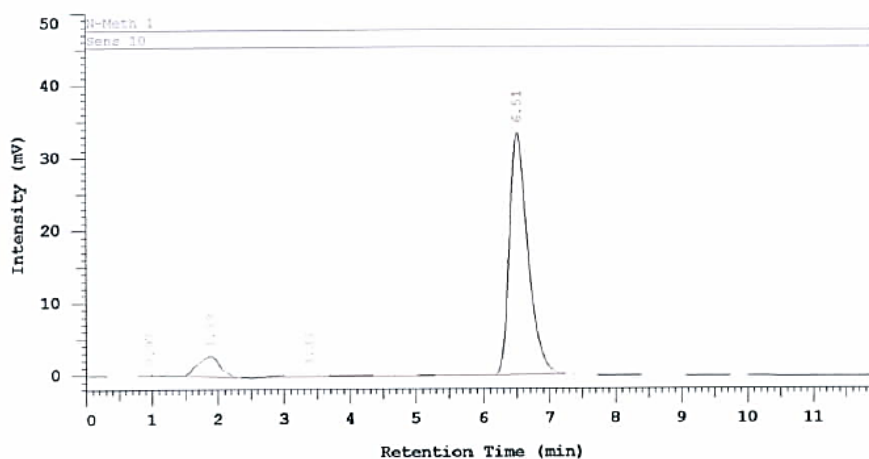
a) Substância ativa

**Figura 7.2 - Cromatograma correspondente à solução padrão a 50% do limite analítico (LA 50%) – SA 7.**

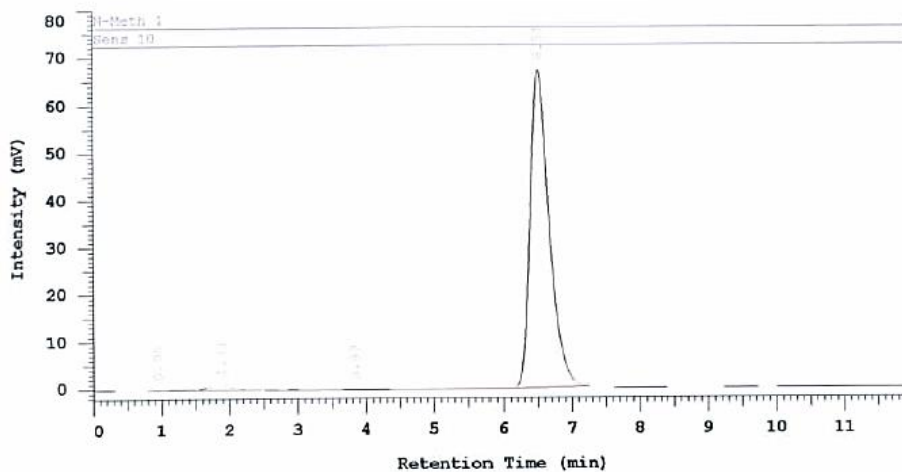




**Figura 7.3 - Cromatograma correspondente à solução padrão ao limite analítico (LA) – SA 7.**

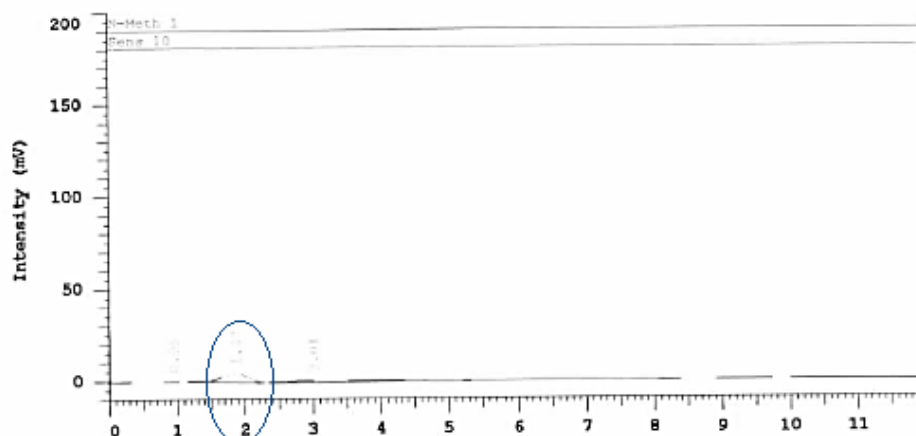


**Figura 7.4 – Cromatograma correspondente à solução padrão a 200% do limite analítico (LA 200%) – SA 7.**



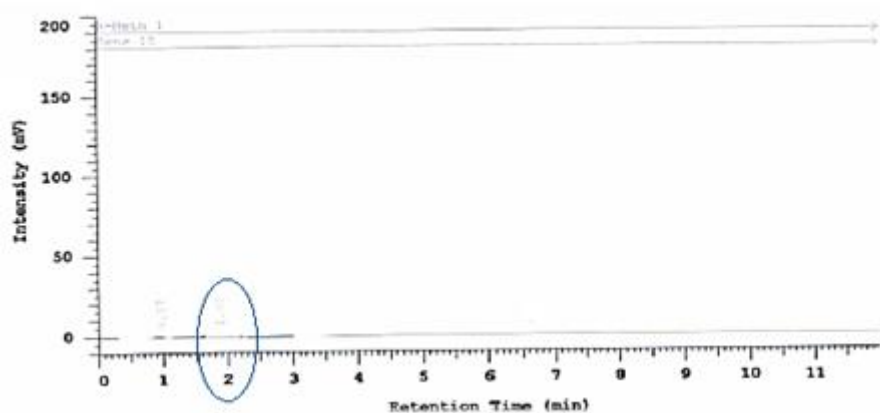
b) Solvente utilizado na preparação das amostras

**Figura 7.5 – Cromatograma correspondente ao solvente de preparação de amostras – SA 7.**



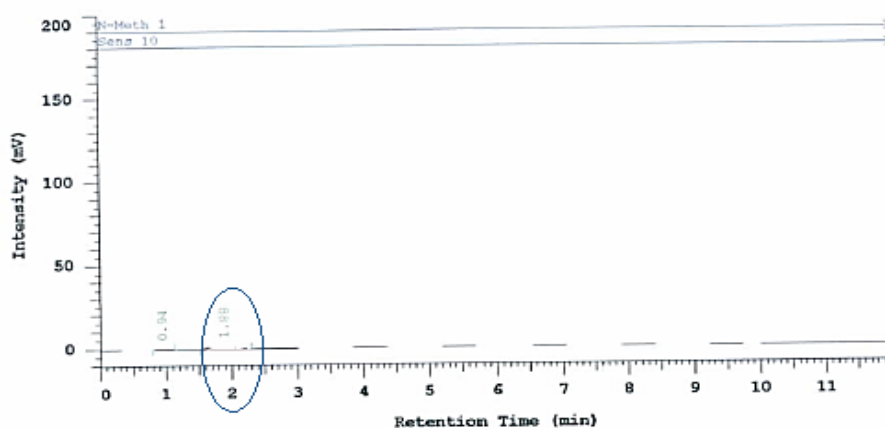
c) Branco de swab

**Figura 7.6 – Cromatograma correspondente ao branco de swab – SA 7.**



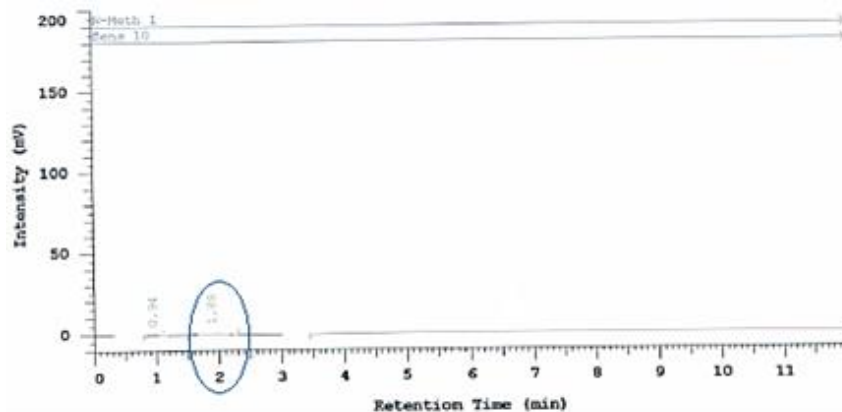
d) Branco de recuperação da placa

**Figura 7.7 - Cromatograma correspondente ao branco de recuperação da placa – SA 7.**



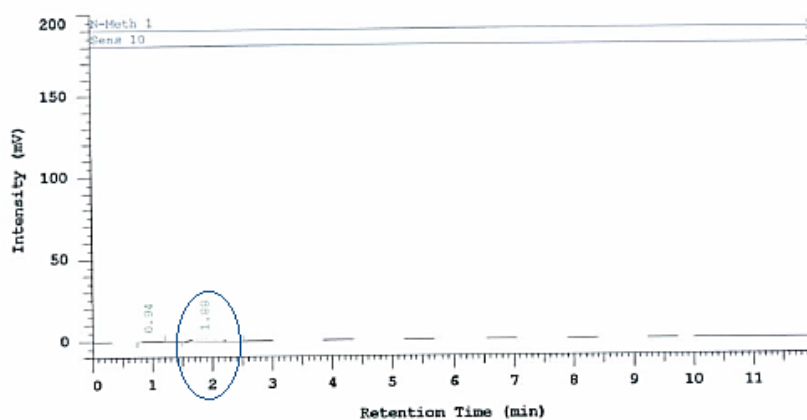
e) Branco de recuperação da placa de detergente e/ou de outras soluções

**Figura 7.8 – Branco de recuperação da placa de detergente – SA 7.**

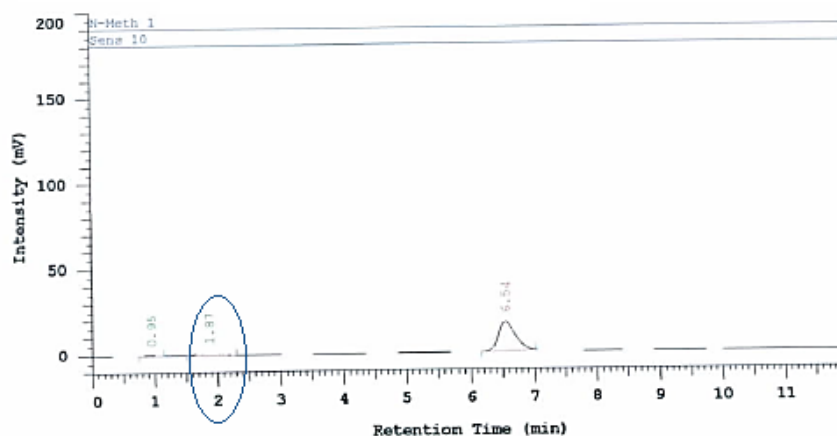


f) Solução de detergente e/ou de outras soluções de lavagem utilizadas a 10ppm

**Figura 7.9 – Cromatograma correspondente à solução de detergente a 10ppm – SA 7.**

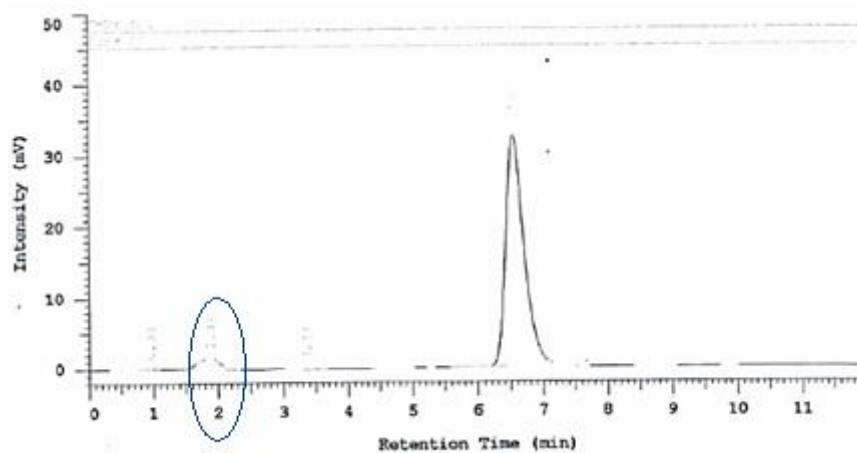


**Figura 7.10 - Cromatograma correspondente à solução de detergente a 10ppm contendo o analito ao nível de concentração de LA 50% - SA 7.**



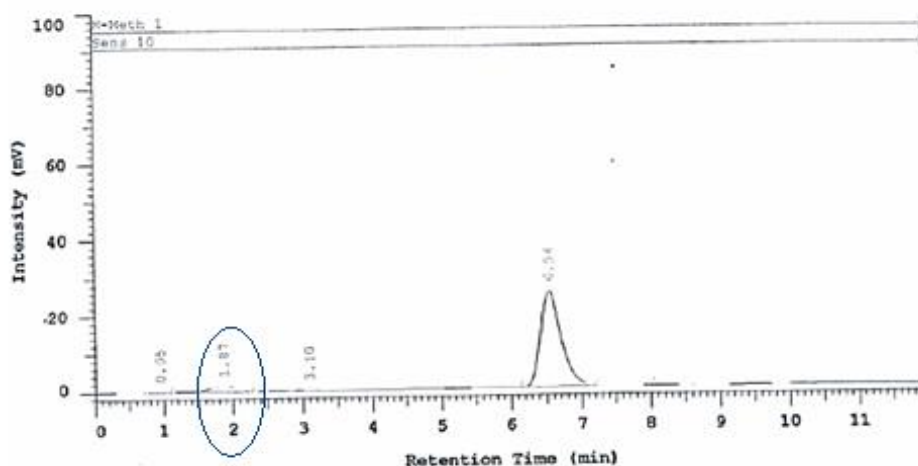
g) Amostra de recuperação do swab

**Figura 7.11 – Cromatograma correspondente à amostra de recuperação de swab – SA 7.**



h) Amostra de recuperação da placa

**Figura 7.12 – Cromatograma correspondente à amostra de recuperação da placa – SA 7.**



Relativamente as figuras 7.2, 7.3 e 7.4, pretendeu-se caracterizar a resposta do método ao analisar soluções com diferentes concentrações do mesmo analito. Verificando-se que o método é capaz de detetar as variações de concentração efetuadas e que o tempo de retenção da substância é de cerca de 6-7 minutos.

Em todas as amostras analisadas pode encontrar-se um pico perto dos 2 minutos correspondente ao solvente utilizado na preparação de soluções, não se verificando quaisquer interferências com a deteção do analito presente nas amostras.

Analisando as figuras 7.8, 7.9 e 7.10, relativas à preparação de soluções com detergente a 10ppm, não se verifica quaisquer interferências na deteção do analito na presença de detergente.

As amostras de branco apresentam uma resposta semelhante à obtida para o solvente, enquanto as amostras recuperação são semelhantes às respostas obtidas para as soluções de caracterização do método, podendo então assegurar-se a capacidade do método para detetar o analito na presença de interferentes.

- **Exatidão/Recuperação**

Nos ensaios de recuperação do *swab* para solvente devem obter-se teores de recuperação entre 90-110% para concentrações ao nível de LA e LA 200%, enquanto para o nível de LA 50% os teores de recuperação devem encontrar-se entre 80-120%. Na análise efetuada obtiveram-se teores de recuperação de 89,69%, 98,46% e 95,97% para LA 50%, LA e LA 200%, respetivamente, encontrando-se estes de acordo com os critérios de aceitação (tabela 7.6).

**Tabela 7.6 – Análise de resultados relativos à recuperação do swab para solvente – SA 7.**

Nível	Toma (mg)	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Teor (%)	Média por nível	Desvio do LA (%)
LA 50%	0,013	303139,50	93,40	89,69	-8,90
		279041,50	85,98		
		291126,50	89,70		
LA	0,027	636290,50	97,23	98,46	0,00
		655435,50	100,16		
		641219,50	97,98		
LA 200%	0,054	1159971,00	89,48	95,97	-2,53
		1286266,50	99,22		
		1286264,00	99,22		
<b>Média</b>	-	-	94,71	-	-
<b>Máximo</b>			100,16		
<b>Mínimo</b>			85,98		
<b>DP</b>			5,22		
<b>CV (%)</b>			5,51		

Nos ensaios de recuperação do método de amostragem a variação entre o teor de recuperação ao nível de LA e os teores de recuperação ao nível LA 50% e LA 200%, não devem ser superiores a 25% e 15%, respetivamente. Na análise efetuada o teor de recuperação de LA 50% apresenta um desvio de 6,79% em relação a LA, enquanto para LA 200% se verifica um desvio de 13,49%, encontrando-se estes de acordo com os critérios de aceitação referidos anteriormente (tabela 7.7).

**Tabela 7.7 - Análise de resultados relativos à recuperação do método de amostragem – SA 7.**

Nível	Toma (mg)	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Teor (%)	Média por nível	Desvio do LA (%)
LA 50%	0,013	240163,00	70,54	69,02	-6,79
		251534,00	73,88		
		213205,00	62,63		
LA	0,027	493603,00	75,55	74,05	0,00
		495727,00	75,84		
		461630,00	70,75		
LA 200%	0,054	1110118,00	85,96	84,04	13,49
		1059245,00	81,84		
		1101293,00	84,31		
<b>Média</b>	-	-	<b>75,70</b>	-	-
<b>Máximo</b>			85,96		
<b>Mínimo</b>			62,63		
<b>DP</b>			7,44		
<b>CV (%)</b>			9,82		

- **Estabilidade**

**Tabela 7.8 – Estabilidade das soluções analíticas à temperatura ambiente com exposição à luz – SA 7.**

<b>A - Temperatura ambiente com exposição à luz</b>			
<b>Tipo de solução</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Teor (%)</b>	<b>Variação (%)</b>
Padrão	0	100,86	-0,93
	24	99,92	
Contaminação	0	76,84	-1,22
	24	75,90	

**Tabela 7.9 - Estabilidade das soluções analíticas à temperatura de 5±3°C ao abrigo da luz – SA 7.**

<b>B - Temperatura de frigorífico e ao abrigo da luz</b>			
<b>Tipo de solução</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Teor (%)</b>	<b>Variação (%)</b>
Padrão	0	100,86	-1,56
	24	99,28	
Contaminação	0	76,84	0,00
	24	76,84	

**Tabela 7.10 – Estabilidade da substância no equipamento – SA 7.**

<b>Amostra</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Teor (%)</b>	<b>Variação (%)</b>
<b>LA</b>	0	76,84	6,69
	24	81,98	

Consideram-se estáveis as soluções padrão e de contaminação se a variação de teor num período de 24 horas não se verificar superior a 5%. Relativamente à estabilidade da substância no equipamento, a substância é considerada estável num período de 24 horas se a variação de teor não se verificar superior a 15%.

De acordo com as variações apresentadas nas tabelas 7.8 e 7.9, pode verificar-se que as soluções padrão e contaminação são estáveis tanto para condições de temperatura ambiente e exposição à luz, como a temperaturas entre 5±3°C sem exposição à luz. Verifica-se também que variação teor de substância no equipamento foi de 6,69%, considerando-se a substância estável num período de 24 horas.

## **7.1.2 Validação do Método de Quantificação de SA 10**

### **7.1.2.1 Teste de Solventes**

De acordo com as metodologias de amostragem estabelecidas, foi necessário encontrar um solvente que apresentasse fácil remoção por aplicação do procedimento de limpeza estabelecido para um determinado equipamento (solvente muito solúvel em água). Antes de se iniciar a validação deste método, optou-se por alterar o solvente de metanol (solvente normalmente utilizado para o doseamento do produto 13) para etanol, por apresentar menor toxicidade.

#### 7.1.2.1.1 Utilização de Etanol como solvente

- **Linearidade**

Na tabela 7.11 apresentam-se os resultados obtidos nos ensaios de teste da linearidade do método de análise.

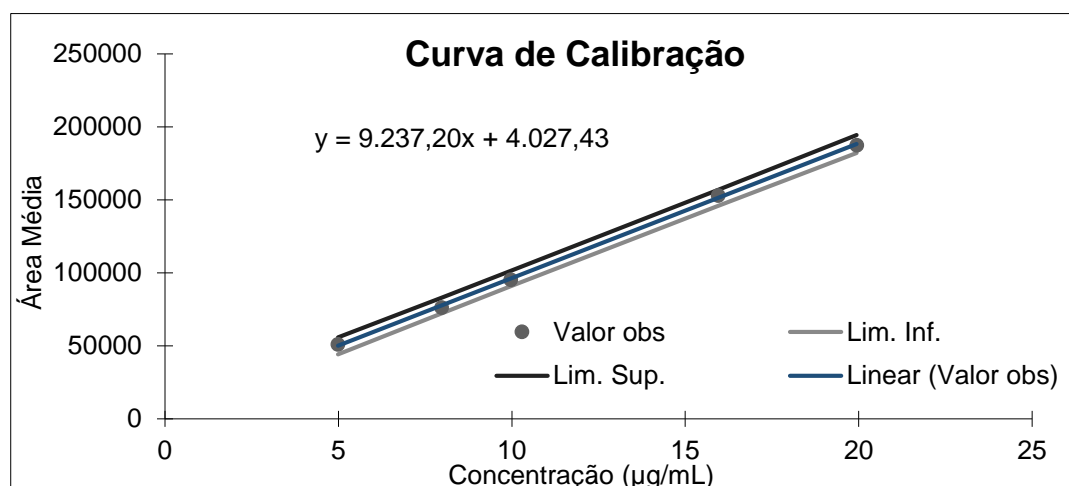
**Tabela 7.11 – Dados relativos à linearidade obtidos para a validação do método analítico (utilizando etanol como solvente) - SA 10.**

Diluição	C (µg/mL)	Área Média (µV*s)	Área Corrigida (µV*s)	Cc (µg/mL)	Viés	Fatores Resposta	Desvio (%)
D1	4,99	51154,50	50074,88	5,10	2,34	10261,69	7,26
D2	7,98	76410,50	77703,34	7,84	-1,75	9580,05	0,13
D3	9,97	95388,00	96122,32	9,89	-0,80	9567,50	0,00
D4	15,95	153045,00	151379,25	16,13	1,13	9594,09	0,28
D5	19,94	187499,00	188217,21	19,86	-0,39	9403,16	-1,72
<b>Média</b>					0,11	9681,30	1,19
<b>DP</b>					-	333,55	-
<b>CV</b>					-	3,45	-

Onde C representa a concentração final da solução (µg/mL), Cc a concentração corrigida da solução final (µg/mL), DP o desvio padrão e CV o coeficiente de variação. Os restantes parâmetros podem calcular-se a partir das equações 7.1, 7.2 e 73.

A gama de trabalho na qual se pretende verificar a linearidade do método analítico será então entre 4,99µg/mL e 19,94µg/mL. A diluição de D3 corresponde à concentração alvo.

A curva de calibração será então a representação dos pontos de área média obtidos após a análise de soluções em função da concentração de SA na amostra (figura 7.13).



**Figura 7.13 – Curva de calibração para a validação do método analítico (utilizando etanol como solvente) - SA 10.**

Por observação da figura 7.13, pode verificar-se que a curva de calibração apresenta um bom ajuste aos pontos em análise. No entanto, o parâmetro que permite aceitar esta curva de calibração como representativa para a gama em análise, será o coeficiente de correlação linear sempre que o valor obtido para este coeficiente se apresente  $\geq 0,99$ .

Este coeficiente pode ser determinado através de uma estatística de regressão, tendo sido obtido para o decorrente estudo o valor de 0,9997, apresentando-se de acordo com o critério de aceitação.

Pode determinar-se os limites de quantificação e de deteção com base na curva de calibração, por aplicação das equações 5.8 e 5.9, tendo-se obtido os limites apresentados na tabela 7.12.

**Tabela 7.12 – Limite de quantificação e limite de deteção (utilizando o etanol como solvente) – SA 10.**

Limite de Quantificação	Limite de Deteção
1,61µg/mL	0,53µg/mL

- Limite de Quantificação (LQ)**

De acordo com os resultados apresentados na tabela 7.13, ao nível de concentração em estudo verifica-se que o método apresenta um grau de precisão adequado, tendo sido obtido um coeficiente de variação de 3,33%, inferior ao critério de aceitação ( $CV \leq 15\%$ ).

**Tabela 7.13 – Confirmação do limite de quantificação (utilizando etanol como solvente) – SA 10.**

Leitura	Área (µV*s)	Média	Máxima
1	10911,00	10903,67	11590,00
2	10662,00	Mínima	DP
3	11590,00	10633,00	362,57
4	10633,00	CV (%)	3,33
5	10951,00		
6	10675,00		

- Precisão**

Relativamente à precisão do sistema, de acordo com os resultados apresentados na tabela 7.14, tendo-se verificado para a concentração ao nível de LA 50%  $CV \leq 15\%$  e para as concentrações ao nível de LA e LA 200%  $CV \leq 10\%$  pode então concluir-se, que este parâmetro cumpre os critérios de aceitação estabelecidos.

No que diz respeito à repetibilidade do método, de acordo com os resultados apresentados na tabela 7.15, nos estudos de recuperação efetuados apenas a recuperação do swab e da placa para solvente cumprem o critério de aceitação estabelecido ( $CV \leq 15\%$ ), falhando a repetibilidade para a recuperação do método de amostragem apresentando CV de 22,92%.



**Tabela 7.14 – Análise da precisão do sistema (utilizando o etanol como solvente) – SA 10.**

Leitura	LA 50%	LA	LA 200%
	Área (µV*s)	Área (µV*s)	Área (µV*s)
1	46874,00	94106,00	183813,00
2	50610,00	94551,00	185694,00
3	45208,00	95273,00	239174,00
4	47140,00	96573,00	185848,00
5	46167,00	93477,00	187130,00
6	45606,00	93784,00	184892,00
7	-	93458,00	-
8		95503,00	
9		94616,00	
10		93840,00	
Área Média (µV*s)	46934,17	94518,10	194425,17
Área Máxima (µV*s)	50610,00	96573,00	239174,00
Área Mínima (µV*s)	45208,00	93458,00	183813,00
DP	1943,71	1008,27	2529,34
CV (%)	4,14	1,07	1,36

**Tabela 7.15 – Análise da repetibilidade (utilizando etanol como solvente) – SA 10.**

	Recuperação do Swab para o solvente		Recuperação do Método de Amostragem		Recuperação Placa para solvente	
Amostras	Área (µV*s)	Teor (%)	Área (µV*s)	Teor (%)	Área (µV*s)	Teor (%)
LA						
Padrão (inj1)	91766,00	-	100990,00	-	91766,00	-
Padrão (inj2)	89528,00		88961,00		89528,00	
1	-	-	35742,00	38	87518,00	97
2	84990,00	95	44856,00	48	96859,00	108
3	87260,00	97	54811,00	58	86227,00	96
4	83792,00	93	59318,00	63	93105,00	104
5	87274,00	97	57990,00	62	65560,00	73
6	90082,00	100	71454,00	76	86010,00	96
Média	-	96,55	-	57,44	-	95,66
Máximo		100,34		75,96		107,89
Mínimo		93,33		38,00		73,02
DP		2,70		13,16		12,08
CV (%)		2,79		22,92		12,63

- Exatidão/Recuperação**

Nos ensaios de recuperação do *swab* para solvente (tabla 7.16) devem obter-se teores de recuperação entre 90-110% para concentrações ao nível de LA e LA 200%, enquanto para o nível de LA 50% os teores de recuperação devem encontrar-se entre 80-120%. Na análise efetuada

obtiveram-se teores de recuperação de 97,83%, 96,36% e 97,01% para LA 50%, LA e LA 200%, respetivamente, encontrando-se estes de acordo com os critérios de aceitação.

**Tabela 7.16 – Análise de resultados relativos à recuperação do swab para solvente (utilizando etanol como solvente) – SA 10.**

Nível	Toma (mg)	Área ( $\mu V \cdot s$ )	Teor (%)	Média por nível	Desvio do LA (%)
LA 50%	0,005	48225,00	99,90	97,83	1,52
		49008,00	101,52		
		44444,00	92,06		
LA	0,01	84990,00	94,67	96,36	0,00
		87260,00	97,20		
		87274,00	97,21		
LA 200%	0,02	175253,00	96,36	97,01	0,68
		177127,00	97,39		
		176913,00	97,27		
<b>Média</b>	-	-	97,06	-	-
<b>Máximo</b>			101,52		
<b>Mínimo</b>			92,06		
<b>DP</b>			2,72		
<b>CV (%)</b>			2,80		

**Tabela 7.17 – Análise de resultados relativos à recuperação do método de amostragem (utilizando etanol como solvente) – SA 10.**

Nível	Toma (mg)	Área ( $\mu V \cdot s$ )	Teor (%)	Média por nível	Desvio do LA (%)
LA 50%	0,005	23657,00	50,27	58,32	-5,33
		32549,00	69,17		
		26132,00	55,53		
LA	0,01	54811,00	58,86	61,61	000
		59318,00	63,70		
		57990,00	62,27		
LA 200%	0,02	144283,00	75,75	73,00	18,50
		160466,00	84,25		
		112390,00	59,01		
<b>Média</b>	-	-	<b>64,31</b>	-	-
<b>Máximo</b>			84,25		
<b>Mínimo</b>			50,27		
<b>DP</b>			10,54		
<b>CV (%)</b>			16,39		

Nos ensaios de recuperação do método de amostragem (tabela 7.17) a variação entre o teor de recuperação ao nível de LA e os teores de recuperação ao nível LA 50% e LA 200%, não devem ser superiores a 25% e 15%, respetivamente. Na análise efetuada o teor de recuperação de LA 50%

apresenta um desvio de 5,33% em relação a LA, enquanto para LA 200% se verifica um desvio de 18,50%, encontrando-se o desvio entre LA 200% e LA fora dos critérios de aceitação referidos anteriormente.

**Tabela 7.18 - Análise de resultados relativos à recuperação da placa para solvente (utilizando etanol como solvente) – SA 10.**

Nível	Toma (mg)	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Teor (%)	Média por nível	Desvio do LA (%)
LA 50%	0,005	45705,00	94,68	93,33	-3,24
		47205,00	97,78		
		42252,00	87,52		
LA	0,01	87518,00	97,48	96,45	0,00
		86227,00	96,04		
		86010,00	95,82		
LA 200%	0,02	159546,00	87,74	96,90	0,47
		181287,00	99,68		
		187831,00	103,28		
<b>Média</b>	-	-	<b>95,56</b>	-	-
<b>Máximo</b>			103,28		
<b>Mínimo</b>			87,52		
<b>DP</b>			5,15		
<b>CV (%)</b>			5,39		

Nos ensaios de recuperação da placa para solvente (tabela 7.18) a variação entre o teor de recuperação ao nível de LA e os teores de recuperação ao nível LA 50% e LA 200%, não devem ser superiores a 25% e 15%, respetivamente. Na análise efetuada o teor de recuperação de LA 50% apresenta um desvio de 3,24% em relação a LA, enquanto para LA 200% se verifica um desvio de 0,47%, encontrando-se estes de acordo com os critérios de aceitação referidos anteriormente.

#### 7.1.2.1.2 Teste de Identificação de Solvente

Verificou-se que o método de análise para a amostragem com *swab* falha nos estudos efetuados aos parâmetros de repetibilidade e de exatidão (22,92%. 18,50%, respetivamente).

Antes de se iniciar uma nova pesquisa afastando completamente a utilização de metanol e etanol como solventes de amostragem e de preparação soluções, foram efetuados três ensaios de recuperação:

- Contaminando um *swab* com metanol, e utilizando etanol como solvente de preparação de soluções;
- Utilizando apenas metanol;
- Utilizando apenas etanol (para despiste de possível falha associada a aplicação ineficiente do método de amostragem).

**Tabela 7.19 – Análise da recuperação do método de amostragem utilizando a combinação de solventes metanol-etanol.**

Nível	Toma (mg)	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Teor (%)
LA	0,01	74746,00	81,20
		38299,00	41,61
Média	-	-	61,40
DP			28,00
CV (%)			45,60

**Tabela 7.20 - Análise da recuperação do método de amostragem utilizando metanol como solvente.**

Nível	Toma (mg)	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Teor (%)
LA	0,01	64980,00	70,59
		68319,00	74,22
Média	-	-	72,40
DP			2,56
CV (%)			3,54

**Tabela 7.21 - Análise da recuperação do método de amostragem utilizando etanol como solvente.**

Nível	Toma (mg)	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Teor (%)
LA	0,01	57307,00	62,97

Relativamente ao ensaio de combinação de solventes, verificou-se uma discrepância bastante elevada para os teores de recuperação obtidos, excluindo à partida esta hipótese. Para os restantes ensaios, as taxas de recuperação não se apresentam muito elevadas, o que permitiu avançar com a pesquisa de novo solvente afastando parcialmente a hipótese de utilização destes solventes.

**Tabela 7.22 - Análise da recuperação do método de amostragem utilizando fase móvel como solvente.**

Nível	Toma (mg)	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Teor (%)
LA	0,01	70691,00	76,76
		71626,00	77,77
Média	-	-	77,27
DP			0,72
CV (%)			0,93

**Tabela 7.23 - Análise da recuperação do método de amostragem utilizando acetona como solvente.**

Nível	Toma (mg)	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Teor (%)
LA	0,01	88019,00	95,57
		81679,00	88,69
Média	-	-	92,13
DP			4,87
CV (%)			5,28

**Tabela 7.24 - Análise da recuperação do método de amostragem utilizando acetonitrilo como solvente.**

Nível	Toma (mg)	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Teor (%)
LA	0,01	85324,00	92,65
		84993,00	92,29
Média	-	-	92,47
DP			0,25
CV (%)			0,27

A pesquisa de solventes continuou a centrar-se nos mesmos padrões: compostos evaporáveis e solúveis em água. No entanto a utilização de fase móvel como solvente surge da hipótese da recuperação do analito ser ou não influenciada pelo pH do solvente que se pretende utilizar na recuperação.

Facilmente se exclui a hipótese de utilização de fase móvel como solvente uma vez que o teor de recuperação obtido continua relativamente baixo. Já nos ensaios relativos à utilização de acetona e acetonitrilo, os teores de recuperação encontram-se acima dos 90%, tendo-se selecionado acetonitrilo como solvente de amostragem e de preparação de soluções por apresentar teores de recuperação mais consistentes e teor médio de recuperação mais elevado.

No capítulo 5 foram indicadas as condições cromatográficas de trabalho, no entanto as condições apresentadas são relativas à validação do método analítico para quantificação de SA 10 com utilização de acetonitrilo como solvente. Quando inicialmente se iniciou a validação do método analítico utilizando etanol como solvente a coluna utilizada era uma Waters Symmetry C8, 250x4,6mm, 5 $\mu\text{m}$ , necessitando de um caudal de fase móvel de 2mL/min e apresentava um tempo de corrida de 30 minutos. Por forma otimizar os tempos de análise e o gasto de reagentes, antes de se iniciar a nova validação foi testada uma coluna mais pequena e novas condições de trabalho, para garantir que esta otimização seria possível (tabela 5.9).

#### 7.1.2.2 Utilização de Acetonitrilo como Solvente

- **Linearidade**

Na tabela 7.25 apresentam-se os resultados obtidos nos ensaios de teste da linearidade do método de análise.

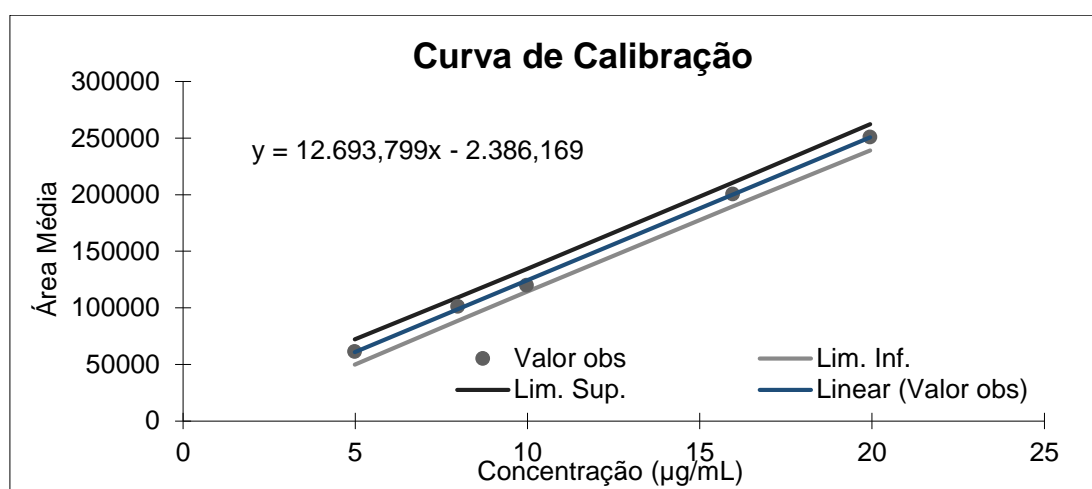
**Tabela 7.25 – Dados relativos à linearidade obtidos para a validação do método analítico (utilizando acetonitrilo como solvente) - SA 10.**

Diluição	C (µg/mL)	Área Média (µV*s)	Área Corrigida (µV*s)	Cc (µg/mL)	Viés	Fatores Resposta	Desvio (%)
D1	4,99	61454,50	60892,42	5,029	0,89	12327,88	2,40
D2	7,98	101360,50	98859,57	8,173	2,47	12708,19	5,56
D3	9,97	120024,50	124171,01	9,643	-3,28	12038,57	0,00
D4	15,95	200861,00	200105,32	16,012	0,37	12591,59	4,59
D5	19,94	251056,00	250728,19	19,966	0,13	12590,57	4,59
				Média	0,12	12451,36	3,43
				DP	-	269,56	-
				CV		2,16	

Onde C representa a concentração final da solução ( $\mu\text{g/mL}$ ),  $C_c$  a concentração corrigida da solução final ( $\mu\text{g/mL}$ ), DP o desvio padrão e CV o coeficiente de variação. Os restantes parâmetros podem calcular-se a partir das equações 7.1, 7.2 e 7.3.

A gama de trabalho na qual se pretende verificar a linearidade do método analítico será então entre  $4,99\mu\text{g/mL}$  e  $19,94\mu\text{g/mL}$ . A diluição D3 corresponde à concentração alvo.

A curva de calibração será então a representação dos pontos de área média obtidos após a análise de soluções em função da concentração de SA na amostra (figura 7.14).



**Figura 7.14 - Curva de calibração para a validação do método analítico (utilizando acetonitrilo como solvente) - SA 10.**

Por observação da figura 7.14 pode verificar-se que a curva de calibração apresenta um bom ajuste aos pontos em análise. No entanto, o parâmetro que permite aceitar esta curva de calibração como representativa para a gama em análise, será o coeficiente de correlação linear sempre que o valor obtido para este coeficiente se apresente  $\geq 0,99$ .

Este coeficiente pode ser determinado através de uma estatística de regressão, tendo sido obtido para o decorrente estudo o valor de 0,9995, apresentando-se de acordo com o critério de aceitação.

Pode determinar-se os limites de quantificação e de deteção com base na curva de calibração, por aplicação das equações 5.8 e 5.9, tendo-se obtido os limites apresentados na tabela 7.26:

**Tabela 7.26 – Limite de quantificação e limite de deteção (utilizando acetonitrilo como solvente) – SA 10.**

Limite de Quantificação	Limite de Deteção
2,25 $\mu\text{g/mL}$	0,74 $\mu\text{g/mL}$

- **Limite de Quantificação (LQ)**

De acordo com os resultados apresentados na tabela 7.27, ao nível de concentração em estudo verifica-se que o método apresenta um grau de precisão adequado, tendo sido obtido um coeficiente de variação de 3,41%, inferior ao critério de aceitação ( $CV \leq 15\%$ ).

**Tabela 7.27 – Confirmação do limite de quantificação (utilizando acetonitrilo como solvente) - SA 10.**

Leitura	Área ( $\mu V \cdot s$ )	Área Média ( $\mu V \cdot s$ )	Área Máxima ( $\mu V \cdot s$ )
1	24926,00	24803	25946
2	25946,00	Área Mínima ( $\mu V \cdot s$ )	DP
3	25407,00	23511	846,80
4	24337,00	CV (%)	3,41
5	24691,00		
6	23511,00		

- **Precisão**

Relativamente à precisão do sistema, de acordo com os resultados apresentados na tabela 7.28, tendo-se verificado para a concentração ao nível de LA 50%  $CV \leq 15\%$  e para as concentrações ao nível de LA e LA 200%  $CV \leq 10\%$  pode então concluir-se, que este parâmetro cumpre os critérios de aceitação estabelecidos.

No que diz respeito à repetibilidade do método, de acordo com os resultados apresentados na tabela 7.29, os estudos de recuperação efetuados apresentam  $CV \leq 15\%$ , cumprindo o critério de aceitação estabelecido.

**Tabela 7.28 – Análise da precisão do sistema (utilizando acetonitrilo como solvente) – SA 10.**

Leitura	LA 50%	LA	LA 200%
	Área ( $\mu V \cdot s$ )	Área ( $\mu V \cdot s$ )	Área ( $\mu V \cdot s$ )
1	57089,00	120854,00	247545,00
2	58540,00	122633,00	251041,00
3	58939,00	121170,00	247086,00
4	57928,00	120183,00	246009,00
5	58002,00	120161,00	248163,00
6	58315,00	120961,00	246399,00
7	-	121223,00	-
8		120558,00	
9		121330,00	
10		120672,00	
Área Média ( $\mu V \cdot s$ )	58135,50	120974,50	247707,17
Área Máxima ( $\mu V \cdot s$ )	58939,00	122633,00	251041,00
Área Mínima ( $\mu V \cdot s$ )	57089,00	120161,00	246009,00
DP	632,06	710,63	1807,18
CV (%)	1,09	0,59	0,73

**Tabela 7.29 – Análise da repetibilidade (utilizando acetonitrilo como solvente) – SA 10.**

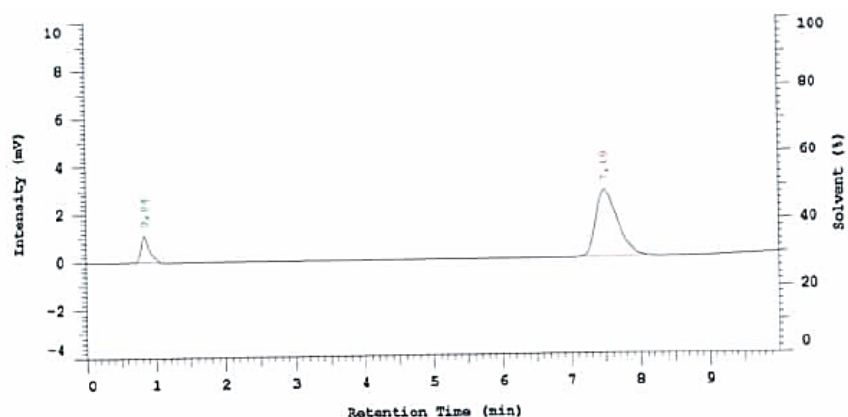
	Recuperação do Swab para o solvente		Recuperação do Método de Amostragem		Recuperação Placa para solvente	
Amostras	Área (μV*s)	Teor (%)	Área (μV*s)	Teor (%)	Área (μV*s)	Teor (%)
LA						
Padrão (inj1)	121051,00	-	124885	-	118653,00	-
Padrão (inj2)	124820,00		123347		126897,00	
1	96581,00	78,56	112949,00	93,73	107166	89,91
2	108782,00	88,49	100804,00	83,65	110556,00	92,75
3	109346,00	88,95	118289,00	98,16	116679,00	97,89
4	115660,00	94,08	117985,00	97,91	110510,00	90,01
5	93319,00	75,91	108617,00	90,14	107011,00	87,16
6	102946,00	83,74	82648,00	68,59	94919,00	77,31
Média	-	84,95	-	88,70	-	89,17
Máximo		94,08		98,16		97,89
Mínimo		75,91		68,59		77,31
DP		6,87		11,24		6,85
CV (%)		8,08		12,67		7,68

- **Seletividade**

Os resultados obtidos relativamente à capacidade do método para detecção de substância ativa na presença de possíveis interferentes são apresentados da figura 7.15 até à figura 7.28.

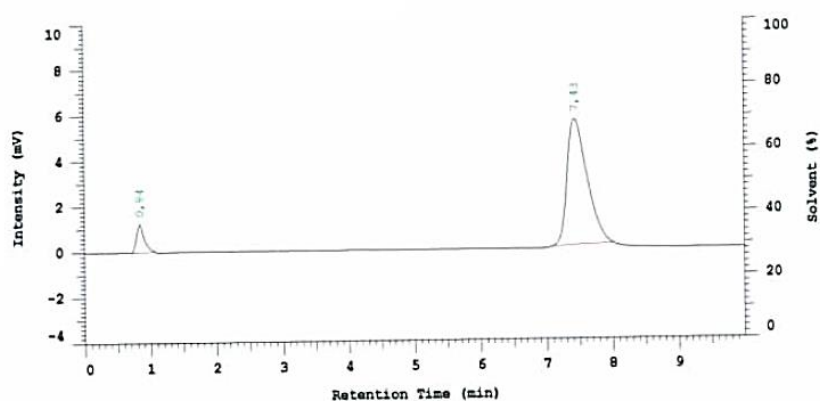
a) Substância ativa

**Figura 7.15 - Cromatograma correspondente à solução padrão a 50% do limite analítico (LA 50%) – SA 10.**

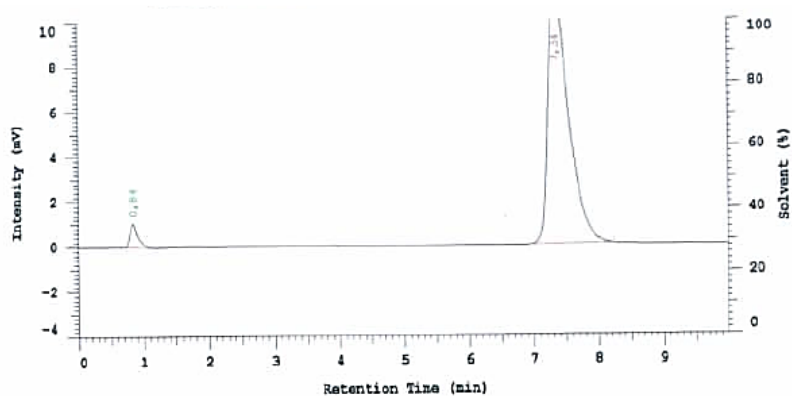




**Figura 7.16 - Cromatograma correspondente à solução padrão ao limite analítico (LA) – SA 10.**

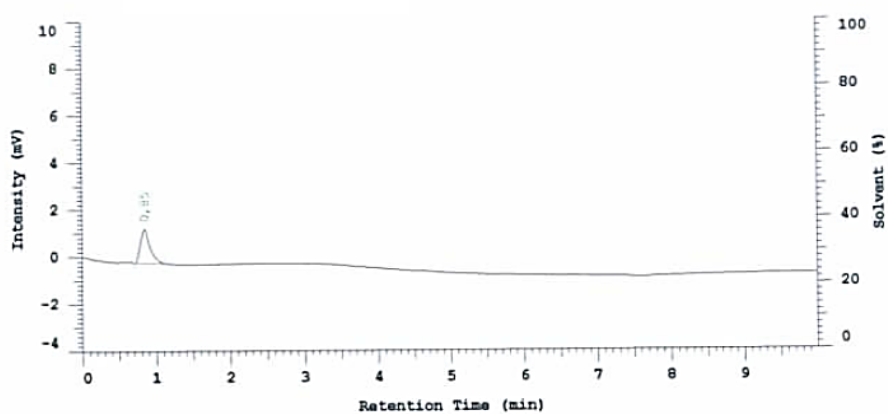


**Figura 7.17 - Cromatograma correspondente à solução padrão a 200% do limite analítico (LA 200%) – SA 10.**



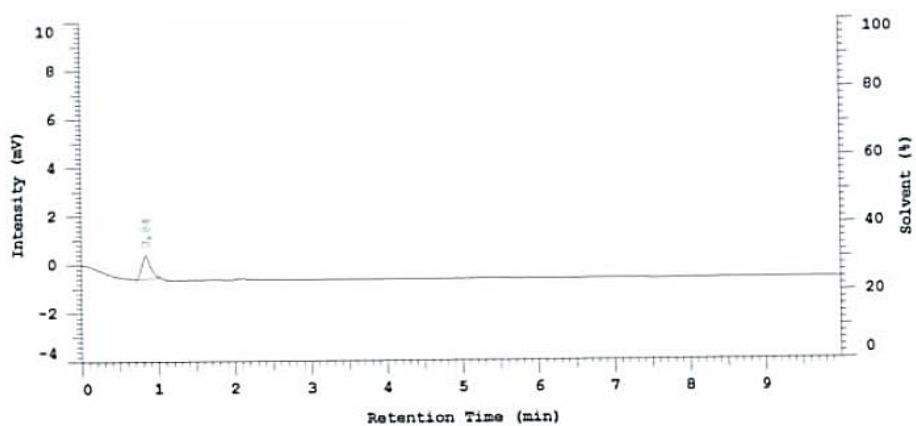
b) Solvente utilizado na preparação das amostras

**Figura 7.18 – Cromatograma correspondente ao solvente de preparação de amostras – SA 10.**



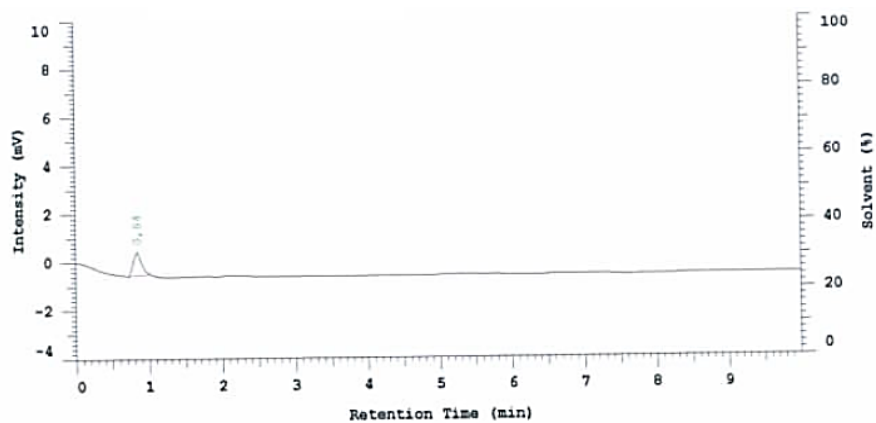
c) Branco de swab

**Figura 7.19 – Cromatograma correspondente ao branco de swab – SA 10.**

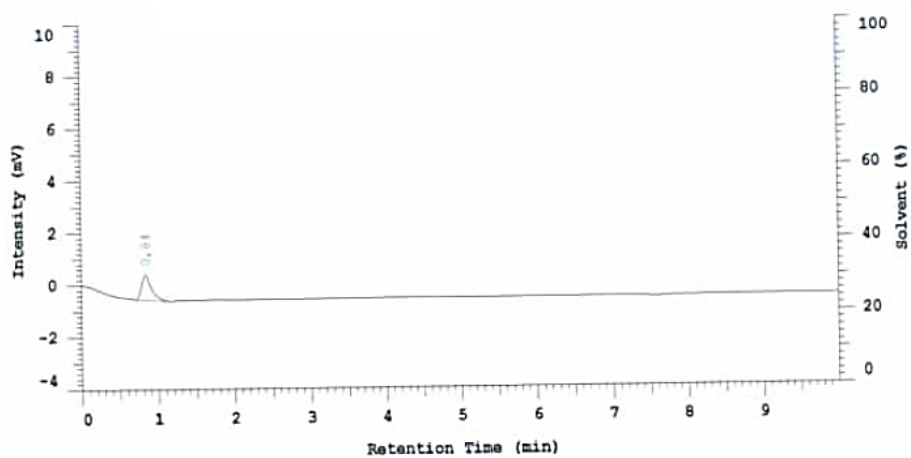


d) Branco de recuperação da placa

**Figura 7.20 – Cromatograma correspondente ao branco de recuperação da placa com swab – SA 10.**

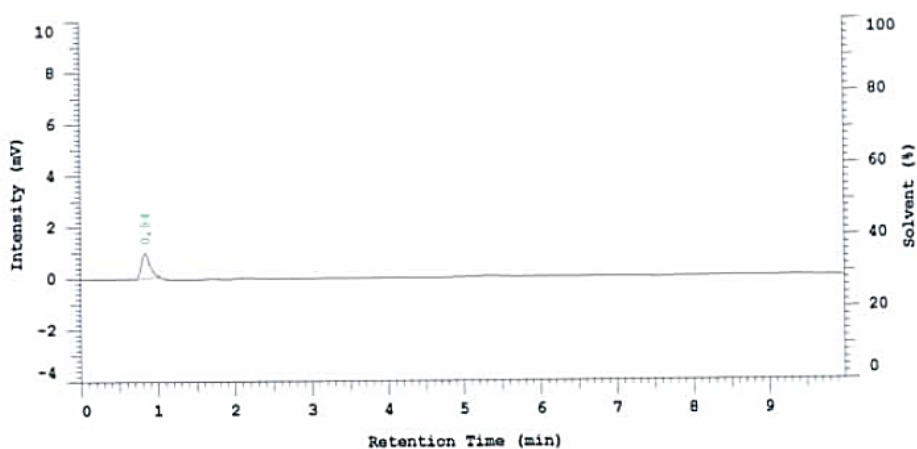


**Figura 7.21 – Cromatograma correspondente ao branco de recuperação de placa com solvente - SA 10.**

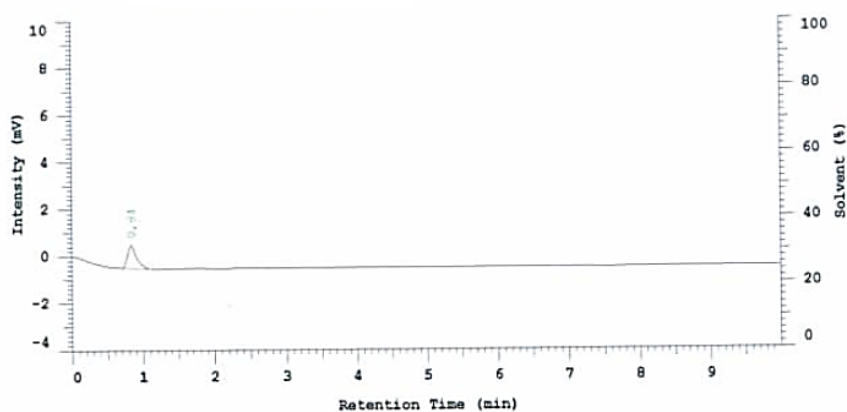


e) Branco de recuperação da placa de detergente e/ou de outras soluções:

**Figura 7.22 – Cromatograma correspondente ao branco de recuperação da placa de detergente com swab – SA 10.**

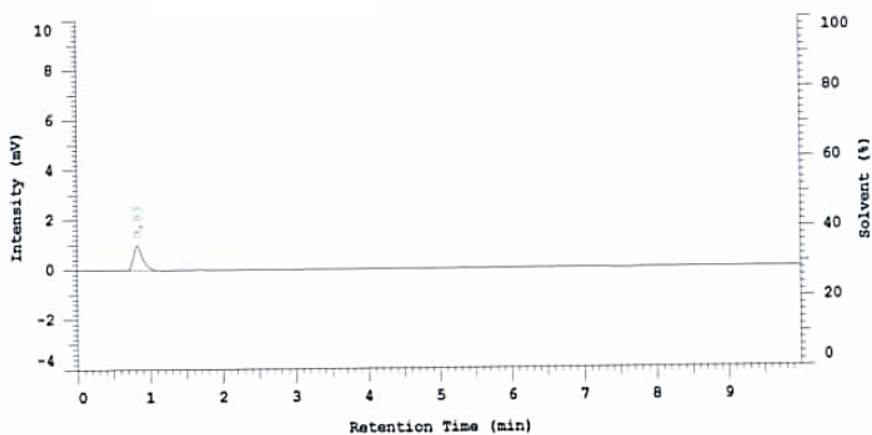


**Figura 7.23 – Cromatograma correspondente ao branco de recuperação da placa de detergente com solvente – SA 10.**

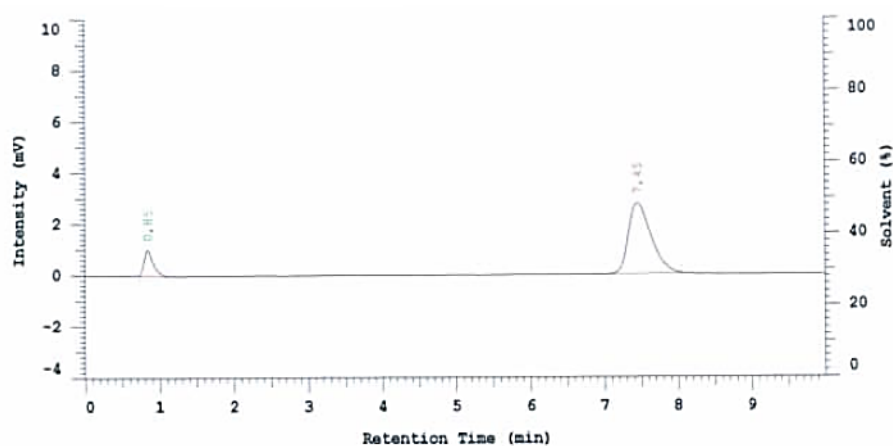


f) Solução de detergente e/ou de outras soluções de lavagem utilizadas a 10ppm

**Figura 7.24 – Cromatograma correspondente à solução de detergente a 10ppm – SA 10.**

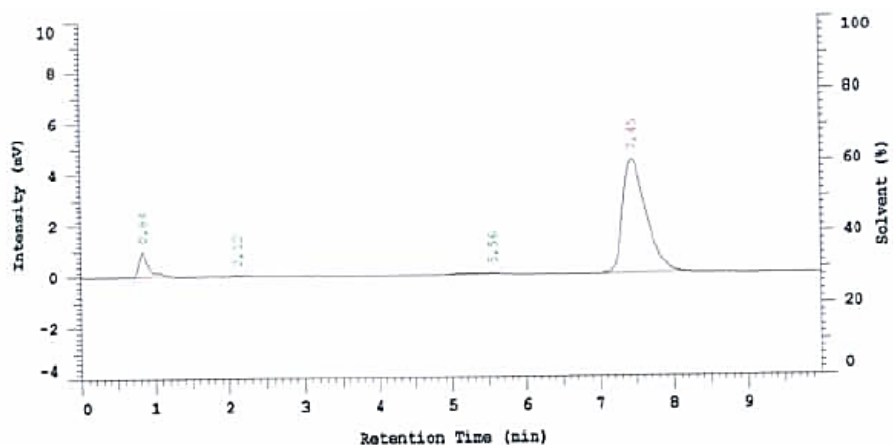


**Figura 7.25 – Cromatograma correspondente à solução de detergente a 10ppm contendo o analito ao nível de LA 50% - SA 10.**



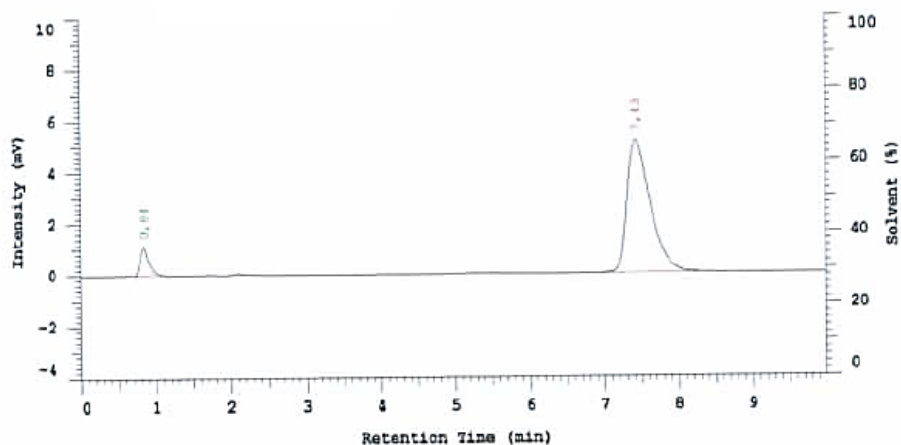
g) Amostra de recuperação do swab

**Figura 7.26 – Cromatograma correspondente à amostra de recuperação do swab – SA10.**

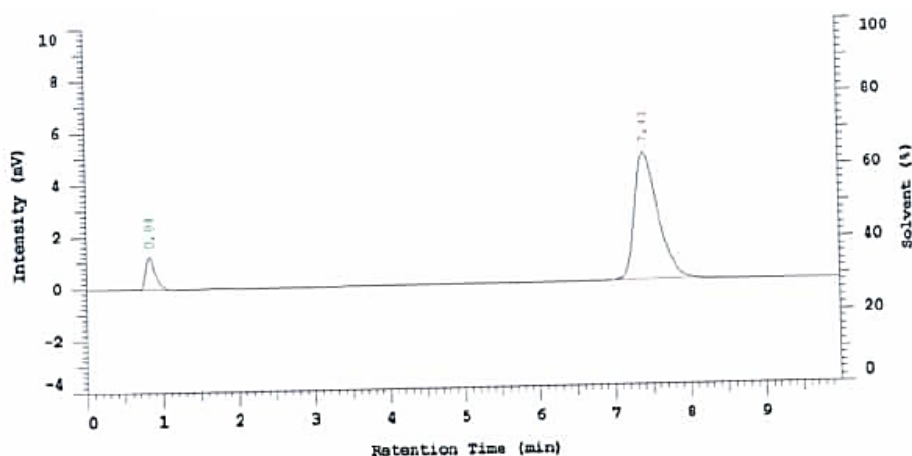


h) Amostra de recuperação da placa

**Figura 7.27 – Cromatograma correspondente à amostra de recuperação da placa com swab – SA 10.**



**Figura 7.28 - Cromatograma correspondente à amostra de recuperação da placa com solvente – SA 10.**



Relativamente as figuras 7.15, 7.16 e 7.17, pretendeu-se caraterizar a resposta do método ao analisar soluções com diferentes concentrações do mesmo analito. Verificando-se que o método é capaz de detetar as variações de concentração efetuadas e que o tempo de retenção da substância é de cerca de 7-8 minutos.

Em todas as amostras analisadas pode encontrar-se um pico um pouco antes de 1 minuto correspondente ao solvente utilizado na preparação de soluções, não se verificando quaisquer interferências com a deteção do analito presente nas amostras.

Analisando as figuras 7.22, 7.23, 7.24 e 7.25, relativas à preparação de soluções com detergente a 10ppm, não se verifica quaisquer interferências na deteção do analito na presença de detergente.

As amostras de branco apresentam uma resposta semelhante à obtida para o solvente, enquanto as amostras recuperação são semelhantes às respostas obtidas para as soluções de caracterização do método, podendo então assegurar-se a capacidade do método para detetar o analito na presença de interferentes.

- **Exatidão/Recuperação**

Nos ensaios de recuperação do *swab* para solvente (tabela 7.30) devem obter-se teores de recuperação entre 90-110% para concentrações ao nível de LA e LA 200%, enquanto para o nível de LA 50% os teores de recuperação devem encontrar-se entre 80-120%. Na análise efetuada obtiveram-se teores de recuperação de 103,87%, 93,22% e 93,87% para LA 50%, LA e LA 200%, respetivamente, encontrando-se estes de acordo com os critérios de aceitação.

Nos ensaios de recuperação do método de amostragem (tabela 7.31) a variação entre o teor de recuperação ao nível de LA e os teores de recuperação ao nível LA 50% e LA 200%, não devem ser superiores a 25% e 15%, respetivamente. Na análise efetuada o teor de recuperação de LA 50% apresenta um desvio de 7,78% em relação a LA, enquanto para LA 200% se verifica um desvio de 1,91%, encontrando-se estes de acordo com os critérios de aceitação referidos anteriormente.

Nos ensaios de recuperação da placa para solvente (tabela 7.32) a variação entre o teor de recuperação ao nível de LA e os teores de recuperação ao nível LA 50% e LA 200%, não devem ser

superiores a 25% e 15%, respetivamente. Na análise efetuada o teor de recuperação de LA 50% apresenta um desvio de 4% em relação a LA, enquanto para LA 200% se verifica um desvio de 6,29%, encontrando-se estes de acordo com os critérios de aceitação referidos anteriormente.

**Tabela 7.30 – Análise de resultados relativos à recuperação do swab para solvente – SA 10.**

Nível	Toma (mg)	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Teor (%)	Média por nível	Desvio do LA (%)
LA 50%	0,005	60637,00	103,71	103,87	11,42
		61173,00	104,63		
		60375,00	103,27		
LA	0,01	108782,00	91,14	93,22	0,00
		109346,00	91,61		
		115660,00	96,90		
LA 200%	0,02	221640,00	92,39	93,87	0,69
		231413,00	96,47		
		222467,00	92,74		
<b>Média</b>	-	-	96,99		
<b>Máximo</b>			104,63		
<b>Mínimo</b>			91,14		
<b>DP</b>			5,54		
<b>CV (%)</b>			5,71		

**Tabela 7.31 - Análise de resultados relativos à recuperação do método de amostragem – SA 10.**

Nível	Toma (mg)	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Teor (%)	Média por nível	Desvio do LA (%)
LA 50%	0,005	60817,00	100,48	96,11	7,78
		56396,00	93,18		
		57303,00	94,68		
LA	0,01	112949,00	91,00	89,18	0,00
		100804,00	81,22		
		118289,00	95,31		
LA 200%	0,02	229277,00	91,32	87,48	-1,91
		192850,00	76,81		
		236718,00	94,29		
<b>Média</b>	-	-	<b>90,92</b>	-	-
<b>Máximo</b>			100,48		
<b>Mínimo</b>			76,81		
<b>DP</b>			7,37		
<b>CV (%)</b>			8,11		

**Tabela 7.32 - Análise de resultados relativos à recuperação da placa para solvente – SA 10.**

Nível	Toma (mg)	Área ( $\mu V \cdot s$ )	Teor (%)	Média por nível	Desvio do LA (%)
LA 50%	0,005	51014,00	82,51	88,03	-4,00
		52833,00	85,46		
		59430,00	96,13		
LA	0,01	107166,00	88,16	91,70	0,00
		110556,00	90,95		
		116679,00	95,99		
LA 200%	0,02	203260,00	81,99	85,93	-6,29
		210488,00	84,91		
		225316,00	90,89		
<b>Média</b>	-	-	<b>88,55</b>	-	-
<b>Máximo</b>			96,13		
<b>Mínimo</b>			81,99		
<b>DP</b>			5,32		
<b>CV (%)</b>			6,01		

- **Estabilidade**

Consideram-se estáveis as soluções padrão e de contaminação se a variação de teor num determinado período de tempo não se verificar superior a 5%. Relativamente à estabilidade da substância no equipamento, a substância é considerada estável num período de 24 horas se a variação de teor não se verificar superior a 15%.

De acordo com as variações apresentadas nas tabelas 7.33 e 7.34, pode verificar-se que a solução padrão é estável tanto para condições de temperatura ambiente e exposição à luz, como a temperaturas entre  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  sem exposição à luz. Recorrendo-se a diferentes metodologias de amostragem, tornou-se necessário estudar para cada método de recuperação a estabilidade da solução de contaminação e da substância no equipamento. Assim, num período de 24 horas verificou-se:

- Para as mesmas condições de conservação apresentadas para a solução padrão, a estabilidade da solução de contaminação tanto para a recuperação do método de amostragem (0,01% e 0,14%, tabela 7.33 e 7.34, respetivamente) como para a recuperação da placa para solvente (2,17% e 2,96%, tabela 7.33 e 7.34, respetivamente);
- A estabilidade da substância no equipamento tendo sido obtidas variações de teor de 2,70% e 7,70% (tabela 7.35), para a recuperação do método de amostragem e da placa para solvente, respetivamente.

**Tabela 7.33 – Estabilidade das soluções analíticas à temperatura ambiente com exposição à luz – SA 10.**

A - Temperatura ambiente com exposição à luz			
Tipo de solução	Tempo (h)	Teor (%)	Variação (%)
Padrão	0	100,92	0,11
	24	101,03	
Recuperação do Método de Amostragem			
Tipo de solução	Tempo (h)	Teor (%)	Variação (%)
Contaminação	0	100,53	-0,01
	24	100,52	
Recuperação da Placa Para Solvente			
Tipo de solução	Tempo (h)	Teor (%)	Variação (%)
Contaminação	0	108,59	-2,17
	24	106,23	

**Tabela 7.34 - Estabilidade das soluções analíticas à temperatura de 5±3°C ao abrigo da luz – SA 10.**

B - Temperatura de frigorífico e ao abrigo da luz			
Tipo de solução	Tempo (h)	Teor (%)	Variação (%)
Padrão	0	100,92	-0,98
	24	99,92	
Recuperação do Método de Amostragem			
Tipo de solução	Tempo (h)	Teor (%)	Variação (%)
Contaminação	0	100,53	-0,14
	24	100,38	
Recuperação da Placa Para Solvente			
Tipo de solução	Tempo (h)	Teor (%)	Variação (%)
Contaminação	0	108,59	-2,96
	24	105,38	

**Tabela 7.35 – Estabilidade da substância no equipamento – SA 10.**

Recuperação do Método de Amostragem			
Amostras	Tempo (h)	Teor (%)	Variação (%)
LA	0	100,53	-2,70
	24	97,81	
Recuperação da Placa Para Solvente			
Amostras	Tempo (h)	Teor (%)	Variação (%)
LA	0	108,59	-7,70
	24	100,22	



## 7.2 Resultados da Validação de Limpeza

### Câmara de Pesagem

De acordo com os resultados apresentados na tabela 7.37, relativamente à inspeção visual comprova-se a conformidade dos diversos pontos considerados para os três lotes em análise (tabela 7.36), bem como a conformidade com os critérios de aceitação relativamente à presença de resíduos de SA e microrganismos. Ainda que se verifique a presença de atividade microbiológica a contagem apresentada é bastante inferior ao limite estabelecido.

**Tabela 7.36 - Informações do processo de amostragem para a validação da Câmara de Pesagem.**

Informações relacionadas com o processo de validação			
Produto 13			
Nº de Amostragem	1	2	3
Lote	D004	D006	D007
Datas dos procedimentos			
Produção	07-05-2015	23-06-2015	29-06-2015
Higienização	11-05-2015	23-06-2015	29-06-2015
Inspeção Visual	21-05-2015	24-06-2015	01-07-2015
Determinação da Atividade Microbiana			
Determinação de Resíduos de Substância Ativa			

**Tabela 7.37 – Resultados de validação da Câmara de Pesagem.**

Inspeção Visual			
Pontos a considerar	1	2	3
Se os componentes foram lavados e secos	C	C	C
Ausência de resíduos de pó em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C	C	C
Ausência de manchas em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C	C	C
Ausência de odores	C	C	C
A área de trabalho está limpa e arrumada	C	C	C
Ausência de escoriações mecânicas	C	C	C
Ausência de fibras, borracha ou tecidos	C	C	C
Ausência de dedadas ou restos de gordura	C	C	C
Ausência de humidade	C	C	C
Determinação da Atividade Microbiana (UFC/Placa)			
Ponto 1	ND	ND	ND
Ponto 2	1	ND	3
Ponto 3	6	2	ND
Ponto 4	4	3	4
Determinação de Resíduos de Substância Ativa (µg/mL)			
Ponto 1	ND	ND	ND
Ponto 2	ND	ND	ND
Ponto 3	ND	ND	ND
Ponto 4	ND	ND	ND

A limpeza que poderia apresentar maior dificuldade associada ao tempo de espera entre a produção e a higienização do equipamento seria então a produção relativa ao lote D004, 4 dias de espera. Tendo em conta os resultados obtidos para as amostragens dos três lotes, não se verificam

discrepâncias nos resultados que possam ser associados ao intervalo de tempo entre a produção e a higienização.

#### **Reservatório 250L (nº4)**

De acordo com os resultados apresentados na tabela 7.39 relativamente à inspeção visual comprova-se a conformidade dos diversos pontos considerados para os três lotes em análise, bem como a conformidade com os critérios de aceitação relativamente à presença de resíduos de SA e microrganismos, ainda que se verifique a presença de atividade microbiológica.

A limpeza que poderia apresentar maior dificuldade associada ao tempo de espera entre a produção e a higienização do equipamento seria então a produção relativa ao lote D004, 6 dias de espera (tabela 7.38). Tendo em conta os resultados obtidos para as amostragens dos três lotes, não se verificam discrepâncias nos resultados que possam ser associados ao intervalo de tempo entre a produção e a higienização.

***Tabela 7.38 - Informações do processo de amostragem para a validação do Reservatório de 250L (nº4).***

<b>Informações relacionadas com o processo de validação</b>				
<b>Produto 13</b>				<b>Produto 5</b>
<b>Nº de Amostragem</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Lote</b>	<b>D004</b>	<b>D001<sup>a</sup></b>	<b>D007</b>	<b>D001</b>
<b>Datas dos procedimentos</b>				
<b>Produção</b>	12-05-2015	12-06-2015	03-07-2015	08-07-2015
<b>Higienização</b>	18-05-2015	13-06-2015	04-07-2015	13-07-2015
<b>Inspeção Visual</b>	21-05-2015	15-06-2015	06-07-2015	-
<b>Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza</b>				
<b>Determinação da Atividade Microbiana*</b>	-	15-06-2015	06-07-2015	20-07-2015
<b>Determinação de Resíduos de Substância Ativa</b>	22-05-2015	15-06-2015	06-07-2015	-

a) A partir do lote D005 do produto 13 efetuaram-se dois enchimentos distintos, mudando a capacidade do frasco. A amostragem ao reservatório foi efetuada após o segundo enchimento, daí o segundo lote analisado, embora sendo referente ao produto 13, esteja identificado como D001.

**Tabela 7.39 - Resultados de validação do Reservatório de 250L (nº4).**

Inspeção Visual				
Pontos a considerar	1	2	3	4
Se os componentes foram lavados e secos	C	C	C	-
Ausência de resíduos de pó em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C	C	C	
Ausência de manchas em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C	C	C	
Ausência de odores	C	C	C	
A área de trabalho está limpa e arrumada	C	C	C	
Ausência de escoriações mecânicas	C	C	C	
Ausência de fibras, borracha ou tecidos	C	C	C	
Ausência de dedadas ou restos de gordura	C	C	C	
Ausência de humidade	C	C	C	
Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza: TOC (ppm)				
Branco	0,092	0,073	0,184	-
Amostra A	3,433	0,659	1,697	
Amostra A – Branco	3,341	0,586	1,513	
Determinação da Atividade Microbiana (UFC/mL)				
Branco	-	2	<1	<48
Amostra A	-	6	32	32
Determinação de Resíduos de Substância Ativa (µg/mL)				
Ponto 1	ND	ND	ND	-
Ponto 2	ND	ND	ND	
Ponto 3	ND	ND	ND	
Ponto 4	ND	ND	ND	

### **Reservatório de 100L (nº3)**

Relativamente a este equipamento, tendo sido apenas efetuada uma amostragem para validação não é possível concluir relativamente a eficácia do procedimento de limpeza estabelecido. No entanto, verifica-se a conformidade das análises efetuadas com os critérios de aceitação estabelecidos (tabela 7.40 e 7.41).

**Tabela 7.40 - Informações do processo de amostragem para a validação do Reservatório de 100L (nº3).**

<b>Informações relacionadas com o processo de validação</b>	
Produto 12	
Nº de Amostragem	1
Lote	D002
Datas dos procedimentos	
Produção	15-07-2015
Higienização	22-07-2015
Inspeção Visual	29-07-2015
Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza	
Determinação da Atividade Microbiana	30-07-2015
Determinação de Resíduos de Substância Ativa	

**Tabela 7.41 - Resultados de validação do Reservatório de 100L (nº3).**

<b>Inspeção Visual</b>	
Pontos a considerar	1
Se os componentes foram lavados e secos	C
Ausência de resíduos de pó em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C
Ausência de manchas em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C
Ausência de odores	C
A área de trabalho está limpa e arrumada	C
Ausência de escoriações mecânicas	C
Ausência de fibras, borracha ou tecidos	C
Ausência de dedadas ou restos de gordura	C
Ausência de humidade	C
<b>Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza: TOC (ppm)</b>	
Branco	0,191
Amostra A	2,587
Amostra A – Branco	2,396
<b>Determinação da Atividade Microbiana (UFC/Placa)</b>	
Ponto 1	11
Ponto 2	33
<b>Determinação de Resíduos de Substância Ativa (µg/mL)</b>	
Ponto 1	ND
Ponto 2	ND

#### **Reator de 2000L**

De acordo com os resultados apresentados na tabela 7.43, relativamente à inspeção visual comprova-se a conformidade dos diversos pontos considerados para os três lotes em análise (tabela 7.42), bem como a conformidade com os critérios de aceitação relativamente à presença de resíduos de SA e agentes de limpeza. Relativamente à determinação da atividade microbiana, após terem sido recolhidas e analisadas diversas amostras, os resultados obtidos indicam que poderá ser necessário efetuar alterações ao procedimento de limpeza em vigor. As amostras recolhidas após produção do produto 13 e limpeza do equipamento apresentaram atividade microbiana em valor inferior ao critério de aceitação estabelecido. No entanto, para as amostras recolhidas após produção do produto 4 e limpeza deste equipamento o mesmo não se verifica.

Embora um resultado indeterminado não garanta necessariamente que este assim o seja por apresentar um elevado número de unidades formadoras de colónias, a análise efetuada à amostra recolhida após à produção do lote D001<sup>b</sup> e limpeza do equipamento apresenta uma contagem superior ao critério de aceitação estabelecido, sendo importante considerar a hipótese de que o resultado indeterminado possa ser também indicativo de elevado crescimento microbiano.

Numa outra perspetiva, os resultados obtidos podem estar a ser influenciados por algum tipo de falha na aplicação do procedimento de limpeza, sendo necessário proceder a recolha de novas amostras para determinação da atividade microbiana por forma identificar o problema. A partir desta análise poderá então ser efetuada uma decisão relativamente à necessidade de alteração do procedimento de limpeza.

Após a produção do lote D005, verificou-se também a presença de resíduos de SA no equipamento, no entanto em quantidades inferiores ao limite de quantificação.

**Tabela 7.42 - Informações do processo de amostragem para a validação do Reator de 2000L.**

Informações relacionadas com o processo de validação					
Produto 13			Produto 4	Produto 13	Produto 4
Nº de Amostragem	1	2	3	4	5
Lote	D004	D005	D001	D007	D001 <sup>b</sup>
Datas dos procedimentos					
Produção	08-05-2015	06-06-2015	18-06-2015	02-07-2015	03-09-2015
Higienização	20-05-2015	13-06-2015	22-06-2015	04-07-2015	09-09-2015
Inspeção Visual	21-05-2015	15-06-2015	-	06-07-2015	-
Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza			-		-
Determinação da Atividade Microbiana	-		22-06-2015		09-09-2015
Determinação de Resíduos de Substância Ativa	22-05-2015		-		-

b) Alteração do produto 4 para suplemento.

**Tabela 7.43 - Resultados de validação do Reator de 2000L.**

Inspeção Visual					
Pontos a considerar	1	2	3	4	5
Se os componentes foram lavados e secos	C	C	-	C	-
Ausência de resíduos de pó em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C	C		C	
Ausência de manchas em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C	C		C	
Ausência de odores	C	C		C	
A área de trabalho está limpa e arrumada	C	C		C	
Ausência de escoriações mecânicas	C	C		C	
Ausência de fibras, borracha ou tecidos	C	C		C	
Ausência de dedadas ou restos de gordura	C	C		C	
Ausência de humidade	C	C		C	
Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza: TOC (ppm)					
Branco	0,096	0,112	-	0,113	-
Amostra A	12,998	1,801		1,697	
Amostra A – Branco	12,902	1,689		1,584	
Determinação da Atividade Microbiana (UFC/mL)					
Branco	-	6	Incontável	1	<1
Amostra A	-	14	Incontável	3	>LA
Determinação de Resíduos de Substância Ativa (µg/mL)					
Branco	ND	ND		ND	-
Amostra A	ND	<LQ		ND	

### **Reator de 150L**

Relativamente a este equipamento, tendo sido apenas efetuada uma amostragem para validação não é possível concluir relativamente a eficácia do procedimento de limpeza estabelecido. No entanto, verifica-se a conformidade das análises efetuadas com os critérios de aceitação estabelecidos (tabela 7.44 e 7.45).

**Tabela 7.44 - Informações do processo de amostragem para a validação do Reator de 150L.**

Informações relacionadas com o processo de validação	
Produto 12	
Nº de Amostragem	1
Lote	D002
Datas dos procedimentos	
Produção	15-07-2015
Higienização	15-07-2015
Inspeção Visual	29-07-2015
Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza	
Determinação da Atividade Microbiana	

**Tabela 7.45 - Resultados de validação do Reator de 150L.**

Inspeção Visual	
Pontos a considerar	1
Se os componentes foram lavados e secos	C
Ausência de resíduos de pó em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C
Ausência de manchas em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C
Ausência de odores	C
A área de trabalho está limpa e arrumada	C
Ausência de escoriações mecânicas	C
Ausência de fibras, borracha ou tecidos	C
Ausência de dedadas ou restos de gordura	C
Ausência de humidade	C
<b>Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza: TOC (ppm)</b>	
Branco	0,168
Amostra A	4,366
Amostra A – Branco	4,198
<b>Determinação da Atividade Microbiana (UFC/Placa)</b>	
Ponto 1	1
Ponto 2	ND
Ponto 3	ND
Ponto 4	1
Branco (tampão pH7,0)	ND

### **Aagitador de Hélice**

As amostragens efetuadas a este equipamento são consideradas análises complementares. Tendo-se verificado a existência de dois produtos com o mesmo índice de risco, embora o produto 5 não seja o produto-pior caso A, as análises efetuadas devem ser endereçadas nos estudos de validação de limpeza para referenciar a presença de resíduos de SA após o procedimento de limpeza. Neste estudo encontraram-se vestígios de SA no equipamento, embora em quantidades abaixo do limite de quantificação. No entanto, verifica-se a conformidade das análises efetuadas com os critérios de aceitação estabelecidos (tabela 7.46 e 7.47).

**Tabela 7.46 - Informações do processo de amostragem para validação do Agitador de Hélice.**

Informações relacionadas com o processo de validação	
Produto 5	
Nº de Amostragem	1
Lote	D001
Datas dos procedimentos	
Produção	08-07-2015
Higienização	13-07-2015
Inspeção Visual	20-07-2015
Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza	
Determinação da Atividade Microbiana	
Determinação de Resíduos de Substância Ativa	

**Tabela 7.47 - Resultados de validação do Agitador de Hélice.**

Inspeção Visual	
Pontos a considerar	1
Se os componentes foram lavados e secos	C
Ausência de resíduos de pó em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C
Ausência de manchas em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C
Ausência de odores	C
A área de trabalho está limpa e arrumada	C
Ausência de escoriações mecânicas	C
Ausência de fibras, borracha ou tecidos	C
Ausência de dedadas ou restos de gordura	C
Ausência de humidade	C
<b>Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza: TOC (ppm)</b>	
Branco	0,432
Amostra A	1,697
Amostra A – Branco	1,265
<b>Determinação da Atividade Microbiana (UFC/Placa)</b>	
Ponto 1	1
Ponto 2	3
<b>Determinação de Resíduos de Substância Ativa (µg/mL)</b>	
Ponto 1	<LQ
Ponto 2	<LQ

### **Agitador de Duplo Cone**

De acordo com os resultados apresentados na tabela 7.49, relativamente à inspeção visual comprova-se a conformidade dos diversos pontos considerados para os três lotes em análise (tabela 7.48), bem como a conformidade com os critérios de aceitação relativamente à presença de microrganismos. Ainda que verifique a presença de atividade microbiológica a contagem apresentada é bastante inferior ao limite estabelecido.

Relativamente aos resultados obtidos pela análise de TOC, as amostras recolhidas após a produção do lote D004 e higienização do equipamento, apresentam resultados acima do limite estabelecido, verificando-se também inconsistência relativamente à concentração do branco e da amostra A.

**Tabela 7.48 - Informações do processo de amostragem para a validação do Agitador de Duplo Cone.**

Informações relacionadas com o processo de validação			
Produto 13			
Nº de Amostragem	1	2	3
Lote	D004	D005	D007
Datas dos procedimentos			
Produção	06-05-2015	04-06-2015	29-06-2015
Higienização	13-05-2015	13-06-2015	04-07-2015
Inspeção Visual	18-05-2015	15-06-2015	13-07-2015
Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza			
Determinação da Atividade Microbiana			

**Tabela 7.49 - Resultados de validação do Agitador de Duplo Cone.**

Inspeção Visual			
Pontos a considerar	1	2	3
Se os componentes foram lavados e secos	C	C	C
Ausência de resíduos de pó em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C	C	C
Ausência de manchas em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C	C	C
Ausência de odores	C	C	C
A área de trabalho está limpa e arrumada	C	C	C
Ausência de escoriações mecânicas	C	C	C
Ausência de fibras, borracha ou tecidos	C	C	C
Ausência de dedadas ou restos de gordura	C	C	C
Ausência de humidade	C	C	C
<b>Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza: TOC (ppm)</b>			
Branco	17,189	0,054	0,201
Amostra A	13,761	0,143	2,587
Amostra A – Branco	-	0,089	2,386
<b>Determinação da Atividade Microbiana (UFC/Placa)</b>			
Ponto 1	ND	ND	1
Ponto 2	ND	3	ND
Ponto 3	1	3	ND
Ponto 4	ND	2	ND

Terá de ser efetuada a recolha de mais uma amostra para análise TOC por forma a completar a validação deste equipamento.

#### **Máquina de Enchimento de Líquidos (nº1)**

De acordo com os resultados apresentados na tabela 7.51, relativamente à inspeção visual comprova-se a conformidade dos diversos pontos considerados para os três lotes em análise (tabela 7.50), bem como a conformidade com os critérios de aceitação relativamente à presença de resíduos de SA, agentes de limpeza e microrganismos. Ainda que se verifique a presença de atividade microbiológica a contagem apresentada é inferior ao limite estabelecido.

Tendo em conta os resultados obtidos para as amostragens dos três lotes, não se verificam discrepâncias nos resultados que possam ser associados ao intervalo de tempo entre a produção e a higienização.



Ainda que o equipamento possa ser considerado validado, não foi possível estabelecer a validade da limpeza do equipamento em tempo útil para este trabalho.

**Tabela 7.50 - Informações do processo de amostragem para a validação da Máquina de Enchimento de Líquidos (nº1).**

Informações relacionadas com o processo de validação				
Produto 13				Produto 4
Nº de Amostragem	1	2	3	4
Lote	D004	D005	D007	D001
Datas dos procedimentos				
Produção	12-05-2015	15-06-2015	03-07-2015	*
Higienização	19-05-2015	16-06-2015	*	*
Inspeção Visual	21-05-2015	17-06-2015	13-07-2015	-
Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza				
Determinação da Atividade Microbiana	22-05-2015		-	09-09-2015
Determinação de Resíduos de Substância Ativa			13-07-2015	-

\*Apesar de o registo de atividade de utilização do equipamento ser efetuado com bastante rigor, não foi possível aceder a esta informação em tempo útil para incluir neste trabalho.

**Tabela 7.51 - Resultados de validação da Máquina de Enchimento de Líquidos (nº1).**

Inspeção Visual				
Pontos a considerar	1	2	3	4
Se os componentes foram lavados e secos	C	C	C	-
Ausência de resíduos de pó em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C	C	C	
Ausência de manchas em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C	C	C	
Ausência de odores	C	C	C	
A área de trabalho está limpa e arrumada	C	C	C	
Ausência de escoriações mecânicas	C	C	C	
Ausência de fibras, borracha ou tecidos	C	C	C	
Ausência de dedadas ou restos de gordura	C	C	C	
Ausência de humidade	C	C	C	
Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza: TOC (ppm)				
Branco	0,096	0,205	0,095	-
Amostra A	5,734	10,005	3,032	
Amostra A – Branco	5,638	9,8	2,937	
Determinação da Atividade Microbiana (UFC/mL)				
Branco	5	3	-	1
Amostra A	4	<1		<1
Determinação de Resíduos de Substância Ativa (µg/mL)				
Branco	ND	ND	ND	-
Amostra A	ND	ND	ND	

#### **Bomba de Trasfega de Líquidos (nº1)**

De acordo com os resultados apresentados na tabela 7.57, relativamente à inspeção visual comprova-se a conformidade dos diversos pontos considerados para os três lotes em análise (tabela 7.56), bem como a conformidade com os critérios de aceitação relativamente à presença de

microrganismos. Ainda que se verifique a presença de atividade microbiológica a contagem apresentada é bastante inferior ao limite estabelecido. Relativamente aos resultados obtidos pela análise de TOC, para as amostras recolhidas após a produção do lote D004 e higienização do equipamento, verifica-se a inconsistência dos resultados relativamente à concentração do branco e da amostra A, tendo sido necessário proceder à recolha de uma nova amostra para conclusão da validação.

**Tabela 7.52 – Informações do processo de amostragem para a validação da Bomba de Trasfega de Líquidos (nº1).**

Informações relacionadas com o processo de validação				
Produto 13				Produto 4
Nº de Amostragem	1	2	3	4
Lote	D004	D005	D007	D001
Datas dos procedimentos				
Produção	08-05-2015	06-06-2015	02-07-2015	03-09-2015
Higienização	13-05-2015	13-06-2015	04-07-2015	07-09-2015
Inspeção Visual	13-05-2015	15-06-2015	06-07-2015	-
Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza				09-09-2015
Determinação da Atividade Microbiana				-

**Tabela 7.53 - Resultados de validação da Bomba de Trasfega de Líquidos (nº1).**

Inspeção Visual				
Pontos a considerar	1	2	3	4
Se os componentes foram lavados e secos	C	C	C	-
Ausência de resíduos de pó em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C	C	C	
Ausência de manchas em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C	C	C	
Ausência de odores	C	C	C	
A área de trabalho está limpa e arrumada	C	C	C	
Ausência de escoriações mecânicas	C	C	C	
Ausência de fibras, borracha ou tecidos	C	C	C	
Ausência de dedadas ou restos de gordura	C	C	C	
Ausência de humidade	C	C	C	
Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza: TOC (ppm)				
Branco	6,883	0,1	0,223	0,216
Amostra A	5,35	3,473	3,476	1,915
Amostra A – Branco	-	3,373	3,253	1,699
Determinação da Atividade Microbiana (UFC/mL)				
Branco	12	4	<1	-
Amostra A	14	3	4	

### **Homogeneizador**

Relativamente a este equipamento, tendo sido apenas efetuada uma amostragem para validação não é possível concluir relativamente a eficácia do procedimento de limpeza estabelecido. No entanto, um dos pontos analisados para determinação da atividade microbiana (ponto 5) apresenta resultados não conclusivos. A exceção deste ponto verifica-se a conformidade das análises efetuadas com os critérios de aceitação estabelecidos (tabelas 7.52 e 7.53).

**Tabela 7.54 - Informações do processo de amostragem para a validação do Homogeneizador.**

Informações relacionadas com o processo de validação	
Produto 12	
Nº de Amostragem	1
Lote	D002
Datas dos procedimentos	
Produção	15-07-2015
Higienização	27-07-2015
Inspeção Visual	29-07-2015
Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza	
Determinação da Atividade Microbiana	
Determinação de Resíduos de Substância Ativa	

**Tabela 7.55 - Resultados de validação do Homogeneizador.**

Inspeção Visual	
Pontos a considerar	1
Se os componentes foram lavados e secos	C
Ausência de resíduos de pó em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C
Ausência de manchas em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C
Ausência de odores	C
A área de trabalho está limpa e arrumada	C
Ausência de escoriações mecânicas	C
Ausência de fibras, borracha ou tecidos	C
Ausência de dedadas ou restos de gordura	C
Ausência de humidade	C
<b>Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza: TOC (ppm)</b>	
Branco	0,142
Amostra A	2,587
Amostra A – Branco	2,445
<b>Determinação da Atividade Microbiana (UFC/Placa)</b>	
Ponto 1	1
Ponto 2	ND
Ponto 3	ND
Ponto 4	ND
Ponto 5	Incontável
Ponto 6	ND
Branco (tampão pH7,0)	ND
<b>Determinação de Resíduos de Substância Ativa (µg/mL)</b>	
Ponto 1	ND
Ponto 2	ND
Ponto 3	ND
Ponto 4	ND
Ponto 5	ND
Ponto 6	ND

#### **Máquina de Enchimento de Pomadas**

Relativamente a este equipamento, tendo sido apenas efetuada uma amostragem para validação não é possível concluir relativamente a eficácia do procedimento de limpeza estabelecido.

No entanto, um dos pontos analisados para determinação da atividade microbiana (ponto 1) apresenta resultados não conclusivos. A exceção deste ponto verifica-se a conformidade das análises efetuadas com os critérios de aceitação estabelecidos (tabelas 7.54 e 7.55).

**Tabela 7.56 - Informações do processo de amostragem para validação da Máquina de Enchimento de Pomadas.**

Informações relacionadas com o processo de validação	
Produto 12	
Nº de Amostragem	1
Lote	D002
Datas dos procedimentos	
Produção	16 a 18-07-2015
Higienização	22-07-2015
Inspeção Visual	29-07-2015
Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza	
Determinação da Atividade Microbiana	
Determinação de Resíduos de Substância Ativa	

**Tabela 7.57 - Resultados de validação da Máquina de Enchimento de Pomadas.**

Inspeção Visual	
Pontos a considerar	1
Se os componentes foram lavados e secos	C
Ausência de resíduos de pó em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C
Ausência de manchas em todo o equipamento, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C
Ausência de odores	C
A área de trabalho está limpa e arrumada	C
Ausência de escoriações mecânicas	C
Ausência de fibras, borracha ou tecidos	C
Ausência de dedadas ou restos de gordura	C
Ausência de humidade	C
<b>Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza: TOC (ppm)</b>	
Branco	0,226
Amostra A	3,476
Amostra A – Branco	3,25
<b>Determinação da Atividade Microbiana (UFC/Placa)</b>	
Ponto 1	Incontável
Ponto 2	1
Ponto 3	3
Ponto 4	ND
Ponto 5	ND
Branco (tampão pH7,0)	ND
<b>Determinação de Resíduos de Substância Ativa (µg/mL)</b>	
Ponto 1	ND
Ponto 2	ND
Ponto 3	ND
Ponto 4	ND
Ponto 5	ND

### 7.2.1 Amostragem de controlo das Validades de Limpezas

Durante os períodos de produção por forma a não se verificar interferências com o planeamento de produção do setor, os tempos de espera entre a higienização do equipamento e a recolha de amostras para os estudos de validação de limpeza são pequenos, sendo assim estabelecidos prazos de validade para a limpeza dos equipamentos muito curtos.

No entanto, muitas vezes os prazos de validade da limpeza podem ser alargados para períodos maiores. Por forma a estudar a possibilidade de alargamento destes prazos de validade efetuou-se a recolha de amostras após um longo período de paragem do setor, podendo observar-se os resultados obtidos para este estudo na tabela 7.58.

**Tabela 7.58 – Determinação da Validade dos Procedimentos de Limpezas.**

Validade dos Procedimentos de Limpeza		
Equipamentos	Lote	Validade
Câmara de Pesagem	D004	10 dias
Reservatório de 250L (nº4)	D001	7 dias
Reservatório de 100L (nº3)	D002	41 dias
Reator de 2000L	-	-
Reator de 150L	D002	34 dias
Agitador de Hélice	D001	50 dias
Agitador de Duplo Cone	D007	59 dias
Máquina de Enchimento de Líquidos (nº1)	-	-
Homogeneizador	D002	36 dias
Máquina de Enchimento de Pomadas	D002	41 dias
Bomba de Trásfega de Líquidos (nº1)	D005/D007	2 dias

Relativamente à máquina de enchimento de líquidos (nº1), não tendo sido possível aceder à folha de registo de atividade do equipamento não foi possível estabelecer neste trabalho um prazo para validade da limpeza deste equipamento. No caso do reator de 2000L, os resultados obtidos após o período de paragem do setor foram elevados, sendo necessário estabelecer um prazo de validade mais pequeno.



## 8 Conclusões

---

Após o decorrer dos ensaios de validação dos métodos analíticos para quantificação de resíduos de SA 7 e SA 10, foi possível garantir a adequabilidade dos métodos de análise em HPLC para as seguintes condições:

- O procedimento de limpeza utiliza o mesmo detergente que o utilizado nos ensaios de validação;
- O equipamento possui superfície de aço inoxidável;
- Os produtos pior-caso sejam um dos produtos validados (produto 11 ou produto 13);
- Os valores de LA (21µg/mL e 9 µg/mL, para o produto 11 e 13, respetivamente) estejam incluídos na gama de trabalho (produto 11: 13,43-53,73µg/mL e produto 13: 4,99-19,94µg/mL);

Relativamente aos procedimentos de validação de limpeza foi possível completar a validação dos seguintes equipamentos:

- Máquina de Enchimento de líquidos (nº1);
- Reservatório de 250L (nº4);
- Câmara de Pesagem;
- Bomba de trasfega de líquidos (nº1) e Mangueiras dedicadas.

Para estes equipamentos não se verificaram quaisquer desvios aos limites de controlo estabelecidos para controlo de contaminações anteriormente referidos no capítulo 6, podendo garantir-se a eficiência e eficácia dos procedimentos de limpeza em vigor para cada um destes equipamentos.

Relativamente ao Agitador de Duplo Cone, a validação de limpeza deste equipamento será considerada completa após recolha e análise de uma amostra para determinação de resíduos agentes de limpeza.

Tendo em conta a baixa frequência de produção de alguns produtos, como é o caso do produto 11 e do produto 7, a validação de limpeza do Agitador de Hélice e dos equipamentos envolvidos na produção de cremes será mais demorada. Após a elaboração da análise de risco para identificação do produto pior-caso A, de acordo com os dados de produção relativos a 2014, verificou-se que a produção já decorrente no ano de 2015 igualou o número de lotes produzidos do produto 11 e 12, e tendo em conta que ambas apresentam a mesma SA e índice de risco, as amostragens efetuadas após produção e higienização dos equipamentos envolvidos na produção do produto 12 serão incluídas nos estudos de validação.

No entanto, por este estudo se encontrar numa fase inicial, ainda não é possível retirar conclusões respeitantes à adequabilidade da limpeza em vigor para estes equipamentos. No caso do Homogeneizador e da Máquina de Enchimento de Pomadas, tendo-se verificado nas análises microbiológicas a existência de pontos onde não foi possível determinar a atividade microbiológica,

deve manter-se um estado alerta relativamente as próximas amostragens por forma a compreender se os resultados obtidos foram apenas pontuais ou se será necessário efetuar alterações nos procedimentos de limpeza do equipamento.

Um pouco à semelhança do que se verificou para os produtos 11 e 12, os produtos 5 e 7 apresentam o mesmo valor de índice de risco, no entanto não apresentam a mesma SA sendo o produto 7 o produto pior-caso A. A recolha de amostras efetuada após higienização e produção do produto 5 são consideradas apenas análises complementares por forma a garantir que os resíduos presentes nos equipamentos após produção e higienização não terão impacto na qualidade do lote que será posteriormente produzido neste equipamento.

Relativamente ao processo de validação de limpeza do Reator de 2000L, embora seja verificada a adequabilidade do procedimento de limpeza no que respeita a determinação de resíduos de agentes de limpeza e de resíduos de substância ativa, a análise de amostras para determinação da atividade microbiana revela a possibilidade de ser necessário efetuar alterações no procedimento de limpeza em vigor. Por forma a identificar a problemática associada e verificar a necessidade de se efetuar alterações no procedimento de limpeza deverá efetuar-se nova recolha de amostras para determinação da atividade microbiana.

As análises efetuadas permitiram a compilação de resultados e desenvolvimento de protocolos/relatórios de validação de procedimentos de limpeza dos respetivos equipamentos. O trabalho desenvolvido nesta dissertação de mestrado está inserido nas responsabilidades do setor da Garantia da Qualidade (GQ), permitindo a elaboração de documentos por forma a comprovar a adequabilidade, eficiência e eficácia dos procedimentos de limpeza aplicados a cada equipamento, bem como a qualidade dos medicamentos produzidos pelos Laboratórios Atral, SA.



## 9 Proposta para Trabalhos Futuros

---

Relativamente a trabalhos futuros, apresenta-se a possibilidade de continuação dos estudos de validação de limpeza para os equipamentos do FLP (Reator de 2000L, Agitador de Duplo Cone, Agitador de Hélice, e equipamentos envolvidos na produção de cremes). Para os equipamentos validados, será também importante efetuar a monitorização dos mesmos, por forma a garantir que os parâmetros de controlo continuam em conformidade com os critérios de aceitação estabelecidos.

Além da revalidação para monitorização, sempre que se verifiquem alterações nos produtos ou procedimentos de limpeza será necessário proceder a nova validação de limpeza do equipamento.

Durante desenvolvimento deste trabalho, aquando a recolha de amostras de água para contagem microbiológica, teve-se em conta a utilização de mangueiras no ponto de água para limpeza do equipamento. No entanto, ainda que a recolha do branco com esta mangueira seja considerado como pior-caso para a amostragem efetuada, esta mangueira confere bastante variabilidade ao estudo. Seria também interessante analisar a influência da utilização destas mangueiras nos procedimentos de limpeza variando as condições de utilização e acondicionamento.



## 10 Referências Bibliográficas

---

- [1] E. Commission, "Introduction," in *EudraLex - Volume 4 Good Manufacturing Practice (GMP) Guidelines*, 2010, pp. 1–3.
- [2] European Commission, "Chapter 1: Pharmaceutical Quality System," in *EudraLex - Volume 4 Good Manufacturing Practice (GMP) Guidelines*, 2012, pp. 1–8.
- [3] A. Neto, A. Souza, and M. Barbosa, "Validação na Indústria Farmacêutica: Uma abordagem direcionada aos sistemas de limpeza."
- [4] C. Europeia, "Anexo 20: Gestão dos Riscos de Qualidade," in *EudraLex - Volume 4 Good Manufacturing Practice (GMP) Guidelines*, 2008, pp. 1–26.
- [5] INFARMED, "Apresentação," 2015. [Online]. Available: [http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/SOBRE\\_O\\_INFARMED/APRESENTACAO](http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/SOBRE_O_INFARMED/APRESENTACAO). [Accessed: 10-Aug-2015].
- [6] DGAV, "About us," 2015. [Online]. Available: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=23815&generico=63257&cboui=63257>. [Accessed: 12-Aug-2015].
- [7] EMA, "About us," 2015. [Online]. Available: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about\\_us/general/general\\_content\\_000235.jsp&mid=](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/general/general_content_000235.jsp&mid=). [Accessed: 11-Aug-2015].
- [8] FDA, "About FDA," 2015. [Online]. Available: <http://www.fda.gov/AboutFDA/WhatWeDo/default.htm>. [Accessed: 11-Aug-2015].
- [9] K. Satinder and P. Bharat, "A review on concept of Cleaning Validation in pharmaceutical Industry," *Int. Res. J. Pharm.*, vol. 3, no. 7, pp. 17–19, 2012.
- [10] H. A. Pawar, N. D. Banerjee, S. Pawar, and P. Pawar, "Current Perspectives on Cleaning Validation in Pharmaceutical Industry: A Scientific and Risk Based Approach," *Int. J. Pharm. Phytopharm. Research*, vol. 1, no. 1, pp. 8–16, 2011.
- [11] S. L. Prabu and T. N. K. Suriyaprakash, "Cleaning Validation and its importance in Pharmaceutical Industry," *Pharma Times*, vol. 42, no. 07, pp. 21–25, 2010.
- [12] W. E. Hall, "Proposed Validation Standard VS-3: Cleaning Validation," pp. 36–55.
- [13] J. P. Algalloco, W. Brame, B. Ferenc, W. E. Hall, K. Jenkins, J. T. LaMagna, R. E. Madsen, M. V. Mullen, D. Wagenknecht, and C. M. Wagner, "Points to Consider for Cleaning Validation," 1998.
- [14] E. Commission, "Annex 15: Qualification and Validation," in *EudraLex - Volume 4 Good Manufacturing Practice (GMP) Guidelines*, vol. 4, 2015, pp. 1–16.
- [15] AtralCipan, "História," 2015. [Online]. Available: <http://www.atralcipan.com/atralcipan/historia>. [Accessed: 17-Sep-2015].
- [16] AtralCipan, "Qualidade, Ambiente e Segurança," 2015. [Online]. Available: <http://www.atralcipan.com/atralcipan/qualidade-ambiente-e-seguranca>. [Accessed: 17-Sep-2015].

- [17] P. V. Waghmare, A. S. Chinchole, B. N. Poul, and O. G. Bhusnure, "A brief review on Cleaning Validation and its significance in Pharmaceutical Industry," *Pharma Sci. Monit.*, vol. 4, no. 4, pp. 165–192, 2013.
- [18] A. Ghosh and S. Dey, "Overview of Cleaning Validation in Pharmaceutical Industry," *Int. J. Pharm. Qual. Assur.*, vol. 2, no. 2, pp. 26–30, 2010.
- [19] B. Lodhi, P. Padamwar, and A. Patel, "Cleaning validation for the pharmaceuticals , biopharmaceuticals , cosmetic and nutraceuticals industries," *J. Innov. Pharm. Biol. Sci.*, vol. 1, no. 1, pp. 27–38, 2014.
- [20] A. Bonneure, T. Buggy, P. Clingan, A. Grootaert, P. Mungenast, L. Paulo, F. Quintiens, C. Vandenbossche, J. Van der Ven, and S. Wienken, "Guidance on Aspects of Cleaning Validation in Active Pharmaceutical Ingredient Plants," no. May. pp. 1–55, 2014.
- [21] A. Walsh, M. Ovais, T. Altmann, and E. V Sargent, "Cleaning Validation for the 21st Century: Acceptance Limits for Cleaning Agents," vol. 33, no. 6, pp. 1–11, 2013.
- [22] I. H. T. Guideline, "Validation of a Analytical Procedures : Text and Methodology Q2 (R1)," in *Guidance*, 2005, p. 17.
- [23] Atral, "Validação de Métodos Analíticos utilizados em Validação de Limpeza", 2015, pp. 1-21
- [24] D. A. Leblanc, "Establishing Scientifically Justified Acceptance Criteria for the Cleaning Validation of APIs," *Pharm. Technol.*, 2000.
- [25] T. Fugate, "Hold Time Studies : A Lost Parameter for Cleaning Validation," *J. Valid. Technol.*, vol. 13, pp. 206–209, 2007.
- [26] European Commission, "Anexo 1: Fabrico de Medicamentos Estéreis," in *Guidelines, EudraLex - Volume 4 Good manufacturing practice (GMP)*, 2008, pp. 1–17.

## 11 Apêndices

### Apêndice I

**Tabela 11.1– Produtos a passar pela câmara de pesagem.**

Câmara de Pesagem								
Produto	SA	Forma Galénica	Quantidade por frasco	[SA] na formulação (%)	Solubilidade (g/L)	Dimensão do lote (Unidades)	Dimensão do lote (Kg)	Toxicidade
Produto 1	SA 1	Xarope	200mL	0,6	10-33,3	9.950	2.000	Média
Produto 2	SA 1	Xarope	200mL	0,3	10-33,3	9.950	2.000	Média
Produto 3	SA 2	Xarope	200mL	0,16	0,1-1	9.950	2.000	Baixa
Produto 4	SA 3 SA 4 SA 5	Xarope	200mL	SA 3: 0,09 SA 4: 0,042 SA 5: 0,00041	SA 3: <0,1 SA 4: <0,1 SA 5: 0,1-1	9.950	2.000	Baixa
Produto 5	SA 2	Gotas Orais	15mL	0,2	0,1-1	12.903	200	Média
Produto 6	SA 6	Spray Nasal	10mL	0,05	100-1000	9.523	100	Alta
Produto 7	SA 7	Loção Capilar	100mL	0,1	<0,1	9.900	1000	Média
Produto 8	SA 8	Creme	15g	5	1-10	6.622	99	Baixa
Produto 9	SA 8	Creme	10g	5	1-10	9.900	99	Baixa
Produto 10	SA 8	Creme	2g	5	1-10	47.619	100	Baixa
Produto 11	SA 7	Creme	30g	0,1	<0,1	6.644	200	Média
Produto 12	SA 7 SA 9	Creme	30g	SA 7: 0,10 SA 9: 0,32	SA 7: <0,1 SA 9: >1000	6.644	200	Média
Produto 13	SA 10	Solução Bucal	200mL	0,074	<0,1	9.950	2000	Alta

**Tabela 11.2 – Produtos a passar pela máquina de enchimento de líquidos (nº1).**

Máquina de Enchimento de Líquidos (nº1)								
Produto	SA	Forma Galénica	Quantidade por frasco	[SA] na formulação (%)	Solubilidade (g/L)	Dimensão do lote (Unidades)	Dimensão do lote (Kg)	Toxicidade
Produto 1	SA 1	Xarope	200mL	0,6	10-33,3	9.950	2.000	Média
Produto 2	SA 1	Xarope	200mL	0,3	10-33,3	9.950	2.000	Média
Produto 3	SA 2	Xarope	200mL	0,16	0,1-1	9.950	2.000	Baixa
Produto 4	SA 3 SA 4 SA 5	Xarope	200mL	SA 3: 0,09 SA 4: 0,042 SA 5: 0,00041	SA 3: <0,1 SA 4: <0,1 SA 5: 0,1-1	9.950	2.000	Baixa
Produto 7	SA 7	Loção Capilar	100mL	0,1	<0,1	9.900	1000	Média
Produto 13	SA 10	Solução Bucal	200mL	0,074	<0,1	9.950	2000	Alta

**Tabela 11.3 – Produtos a passar pela máquina de enchimento de líquidos (nº2).**

Máquina de Enchimento de Líquidos (nº2)								
Produto	SA	Forma Galénica	Quantidade por frasco	[SA] na formulação (%)	Solubilidade (g/L)	Dimensão do lote (Unidades)	Dimensão do lote (Kg)	Toxicidade
Produto 5	SA 2	Gotas Orais	15mL	0,2	0,1-1	12.903	200	Média
Produto 6	SA 6	Spray Nasal	10mL	0,05	100-1000	9.523	100	Alta

**Tabela 11.4 – Produtos a passar pelo agitador de hélice.**

Agitador de Hélice								
Produto	SA	Forma Galénica	Quantidade por frasco	[SA] na formulação (%)	Solubilidade (g/L)	Dimensão do lote (Unidades)	Dimensão do lote (kg)	Toxicidade
Produto 5	SA 2	Gotas Orais	15mL	0,2	0,1-1	12.903	200	Média
Produto 6	SA 6	Spray Nasal	10mL	0,05	100-1000	9.523	100	Alta
Produto 7	SA 7	Loção Capilar	100mL	0,1	<0,1	9.900	1000	Média

**Tabela 11.5 – Produtos a passar pelo agitador de duplo cone.**

Agitador de Duplo Cone								
Produto	SA	Forma Galénica	Quantidade por frasco	[SA] na formulação (%)	Solubilidade (g/L)	Dimensão do lote (Unidades)	Dimensão do lote (Kg)	Toxicidade
Produto 13	SA 10	Solução Bucal	200mL	0,074	<0,1	9.950	2000	Alta

**Tabela 11.6 – Produtos a passar pelo homogeneizador.**

Homogeneizador 200 Litros								
Produto	SA	Forma Galénica	Quantidade por frasco	[SA] na formulação (%)	Solubilidade (g/L)	Dimensão do lote (Unidades)	Dimensão do lote (Kg)	Toxicidade
Produto 8	SA 8	Creme	15g	5	01-out	6.622	99	Baixa
Produto 9	SA 8	Creme	10g	5	01-out	9.900	99	Baixa
Produto 10	SA 8	Creme	2g	5	01-out	47.619	100	Baixa
Produto 11	SA 7	Creme	30g	0,1	<0,1	6.644	200	Média
Produto 12	SA 7 SA 9	Creme	30g	SA 7: 0,10 SA 9: 0,32	SA 7: <0,1 SA 9: >1000	6.644	200	Média

**Tabela 11.7 – Produtos a passar pela máquina de enchimento de pomadas.**

Máquina de Enchimento de Pomadas								
Produto	SA	Forma Galénica	Quantidade por frasco	[SA] na formulação (%)	Solubilidade (g/L)	Dimensão do lote (Unidades)	Dimensão do lote (Kg)	Toxicidade
Produto 8	SA 8	Creme	15g	5	1-10	6.622	99	Baixa
Produto 9	SA 8	Creme	10g	5	1-10	9.900	99	Baixa
Produto 10	SA 8	Creme	2g	5	1-10	47.619	100	Baixa
Produto 11	SA 7	Creme	30g	0,1	<0,1	6.644	200	Média
Produto 12	SA 7 SA 9	Creme	30g	SA 7: 0,10 SA 9: 0,32	SA 7: <0,1 SA 9: >1000	6.644	200	Média

**Tabela 11.8 – Produtos a passar pelas bombas de trasfega e suporte de filtração.**

Suporte de filtração								
Bomba de trasfega de líquidos (nº1)								
Bomba de trasfega de líquidos (nº2)								
Produto	SA	Forma Galénica	Quantidade por frasco	[SA] na formulação (%)	Solubilidade (g/L)	Dimensão do lote (Unidades)	Dimensão do lote (Kg)	Toxicidade
Produto 1	SA 1	Xarope	200mL	0,6	10-33,3	9.950	2.000	Média
Produto 2	SA 1	Xarope	200mL	0,3	10-33,3	9.950	2.000	Média
Produto 3	SA 2	Xarope	200mL	0,16	0,1-1	9.950	2.000	Baixa
Produto 4	SA 3 SA 4 SA 5	Xarope	200mL	SA 3: 0,09 SA 4: 0,042 SA 5: 0,00041	SA 3: <0,1 SA 4: <0,1 SA 5: 0,1-1	9.950	2.000	Baixa
Produto 5	SA 2	Gotas Orais	15mL	0,2	0,1-1	12.903	200	Média
Produto 6	SA 6	Spray Nasal	10mL	0,05	100-1000	9.523	100	Alta
Produto 7	SA 7	Loção Capilar	100mL	0,1	<0,1	9.900	1000	Média
Produto 13	SA 10	Solução Bucal	200mL	0,074	<0,1	9.950	2000	Alta

**Tabela 11.9 – Produtos a passar pelo reator de 2000 litros.**

Reator de 2000 Litros								
Produto	SA	Forma Galénica	Quantidade por frasco	[SA] na formulação (%)	Solubilidade (g/L)	Dimensão do lote (Unidades)	Dimensão do lote (Kg)	Toxicidade
Produto 1	SA 1	Xarope	200mL	0,6	10-33,3	9.950	2.000	Média
Produto 2	SA 1	Xarope	200mL	0,3	10-33,3	9.950	2.000	Média
Produto 3	SA2	Xarope	200mL	0,16	0,1-1	9.950	2.000	Baixa
Produto 4	SA 3 SA 4 SA 5	Xarope	200mL	SA 3: 0,09 SA 4: 0,042 SA 5: 0,00041	SA 3: <0,1 SA 4: <0,1 SA 5: 0,1-1	9.950	2.000	Baixa
Produto 13	SA 10	Solução Bucal	200mL	0,074	<0,1	9.950	2000	Alta

**Tabela 11.10 – Produtos a passar pelo reator de 1000 litros.**

Reator 1000 Litros								
Produto	SA	Forma Galénica	Quantidade por frasco	[SA] na formulação (%)	Solubilidade (g/L)	Dimensão do lote (Unidades)	Dimensão do lote (Kg)	Toxicidade
Produto 7	SA 7	Loção Capilar	100mL	0,1	<0,1	9.900	1000	Média

**Tabela 11.11 – Produtos a passar pelo reator de 150 litros.**

Reator 150 Litros								
Produto	SA	Forma Galénica	Quantidade por frasco	[SA] na formulação (%)	Solubilidade (g/L)	Dimensão do lote (Unidades)	Dimensão do lote (Kg)	Toxicidade
Produto 8	SA 8	Creme	15g	5	1-10	6.622	99	Baixa
Produto 9	SA 8	Creme	10g	5	1-10	9.900	99	Baixa
Produto 10	SA 8	Creme	2g	5	1-10	47.619	100	Baixa
Produto 11	SA 7	Creme	30g	0,1	<0,1	6.644	200	Média
Produto 12	SA 7 SA 9	Creme	30g	SA 7: 0,10 SA 9: 0,32	SA 7: <0,1 SA 9: >1000	6.644	200	Média



**Tabela 11.12 – Produtos a passar pelo reservatório de 350 litros (nº1) e (nº2).**

Reservatório de 350 Litros (nº1) e (nº2)								
Produto	SA	Forma Galénica	Quantidade por frasco	[SA] na formulação (%)	Solubilidade (g/L)	Dimensão do lote (Unidades)	Dimensão do lote (Kg)	Toxicidade
Produto 1	SA 1	Xarope	200mL	0,6	10-33,3	9.950	2.000	Média
Produto 2	SA 1	Xarope	200mL	0,3	10-33,3	9.950	2.000	Média
Produto 3	SA 2	Xarope	200mL	0,16	0,1-1	9.950	2.000	Baixa
Produto 4	SA 3 SA 4 SA 5	Xarope	200mL	SA 3: 0,09 SA 4: 0,042 SA 5: 0,00041	SA 3: <0,1 SA 4: <0,1 SA 5: 0,1-1	9.950	2.000	Baixa
Produto 7	SA 7	Loção Capilar	100mL	0,1	<0,1	9.900	1000	Média
Produto 13	SA 10	Solução Bucal	200mL	0,074	<0,1	9.950	2000	Alta

**Tabela 11.13 – Produtos a passar pelo reservatório de 250 litros (nº1).**

Reservatório de 250 Litros (nº1)								
Produto	SA	Forma Galénica	Quantidade por frasco	[SA] na formulação (%)	Solubilidade (g/L)	Dimensão do lote (Unidades)	Dimensão do lote (Kg)	Toxicidade
Produto 1	SA 1	Xarope	200mL	0,6	10-33,3	9.950	2.000	Média
Produto 2	SA 1	Xarope	200mL	0,3	10-33,3	9.950	2.000	Média
Produto 3	SA 2	Xarope	200mL	0,16	0,1-1g/L	9.950	2.000	Baixa
Produto 4	SA 3 SA 4 SA 5	Xarope	200mL	SA 3: 0,09 SA 4: 0,042 SA 5: 0,00041	SA 3: <0,1 SA 4: <0,1 SA 5: 0,1-1	9.950	2.000	Baixa
Produto 5	SA 2	Gotas Orais	15mL	0,2	0,1-1	12.903	200	Média
Produto 7	SA 7	Loção Capilar	100mL	0,1	<0,1	9.900	1000	Média
Produto 13	SA 13	Solução Bucal	200mL	0,074	<0,1	9.950	2000	Alta

**Tabela 11.14 – Produtos a passar pelo reservatório de 250 litros (nº2), (nº3) e (nº5).**

Reservatório de 250 Litros (nº2), (nº3) e (nº5)								
Produto	SA	Forma Galénica	Quantidade por frasco	[SA] na formulação (%)	Solubilidade (g/L)	Dimensão do lote (Unidades)	Dimensão do lote (Kg)	Toxicidade
Produto 1	SA 1	Xarope	200mL	0,6	10-33,3	9.950	2.000	Média
Produto 2	SA 1	Xarope	200mL	0,3	10-33,3	9.950	2.000	Média
Produto 3	SA 2	Xarope	200mL	0,16	0,1-1	9.950	2.000	Baixa
Produto 4	SA 3 SA 4 SA 5	Xarope	200mL	SA 3: 0,09 SA 4: 0,042 SA 5: 0,00041	SA 3: <0,1 SA 4: <0,1 SA 5: 0,1-1	9.950	2.000	Baixa
Produto 7	SA 7	Loção Capilar	100mL	0,1	<0,1	9.900	1000	Média
Produto 13	SA 10	Solução Bucal	200mL	0,074	<0,1	9.950	2000	Alta

**Tabela 11.15 - Produtos a passar pelo reservatório de 250 litros (nº4).**

Reservatório de 250 Litros (nº4)								
Produto	SA	Forma Galénica	Quantidade por frasco	[SA] na formulação (%)	Solubilidade (g/L)	Dimensão do lote (Unidades)	Dimensão do lote (Kg)	Toxicidade
Produto 1	SA 1	Xarope	200mL	0,6	10-33,3	9.950	2.000	Média
Produto 2	SA 1	Xarope	200mL	0,3	10-33,3	9.950	2.000	Média
Produto 3	SA 2	Xarope	200mL	0,16	0,1-1	9.950	2.000	Baixa
Produto 4	SA 3 SA 4 SA 5	Xarope	200mL	SA 3: 0,09 SA 4: 0,042 SA 5: 0,00041	SA 3: <0,1 SA 4: <0,1 SA 5: 0,1-1	9.950	2.000	Baixa
Produto 5	SA 2	Gotas Orais	15mL	0,2	0,1-1	12.903	200	Média
Produto 6	SA 6	Spray Nasal	10mL	0,05	100-1000	9.523	100	Alta
Produto 7	SA 7	Loção Capilar	100mL	0,1	<0,1	9.900	1000	Média
Produto 13	SA 10	Solução Bucal	200mL	0,074	<0,1	9.950	2000	Alta

**Tabela 11.16 - Produtos a passar pelo reservatório de 100 litros (nº1).**

Reservatório de 100 Litros (nº1)								
Produto	SA	Forma Galénica	Quantidade por frasco	[SA] na formulação (%)	Solubilidade (g/L)	Dimensão do lote (Unidades)	Dimensão do lote (Kg)	Toxicidade
Produto 4	SA 3 SA 4 SA 5	Xarope	200mL	SA 3: 0,09 SA 4: 0,042 SA 5: 0,00041	SA: <0,1 SA: <0,1 SA: 0,1-1	9.950	2.000	Baixa
Produto 6	SA 6	Spray Nasal	10mL	0,05	100-1000	9.523	100	Alta
Produto 8	SA 8	Creme	15g	5	1-10	6.622	99	Baixa
Produto 9	SA 8	Creme	10g	5	1-10	9.900	99	Baixa
Produto 10	SA 8	Creme	2g	5	1-10	47.619	100	Baixa
Produto 11	SA 7	Creme	30g	0,1	<0,1	6.644	200	Média
Produto 12	SA 7 SA 9	Creme	30g	SA 7: 0,10 SA 9: 0,32	SA 7 <0,1 SA 9: >1000	6.644	200	Média
Produto 13	SA 10	Solução Bucal	200mL	0,074	<0,1	9.950	2000	Alta

**Tabela 11.17 - Produtos a passar pelo reservatório de 100 litros (nº2).**

Reservatório de 100 Litros (nº2)								
Produto	SA	Forma Galénica	Quantidade por frasco	[SA] na formulação (%)	Solubilidade (g/L)	Dimensão do lote (Unidades)	Dimensão do lote (Kg)	Toxicidade
Produto 1	SA 1	Xarope	200mL	0,6	10-33,3	9.950	2.000	Média
Produto 2	SA 1	Xarope	200mL	0,3	10-33,3	9.950	2.000	Média
Produto 3	SA 2	Xarope	200mL	0,16	0,1-1	9.950	2.000	Baixa
Produto 4	SA 3 SA 4 SA 5	Xarope	200mL	SA 3: 0,09 SA 4: 0,042 SA 5: 0,00041	SA 3: <0,1 SA 4: <0,1 SA 5: 0,1-1	9.950	2.000	Baixa
Produto 5	SA 2	Gotas Orais	15mL	0,2	0,1-1	12.903	200	Média
Produto 11	SA 7	Creme	30g	0,1	<0,1	6.644	200	Média
Produto 12	SA 7 SA 9	Creme	30g	SA 7: 0,10 SA 9: 0,32	SA 7: <0,1 SA 9: >1000	6.644	200	Média
Produto 13	SA 10	Solução Bucal	200mL	0,074	<0,1	9.950	2000	Alta

**Tabela 11.18 - Produtos a passar pelo reservatório de 100 litros (nº3).**

Reservatório de 100 Litros (nº3)								
Produto	SA	Forma Galénica	Quantidade por frasco	[SA] na formulação (%)	Solubilidade (g/L)	Dimensão do lote (Unidades)	Dimensão do lote (Kg)	Toxicidade
Produto 1	SA 1	Xarope	200mL	0,6	10-33,3	9.950	2.000	Média
Produto 2	SA 1	Xarope	200mL	0,3	10-33,3	9.950	2.000	Média
Produto 3	SA 2	Xarope	200mL	0,16	0,1-1	9.950	2.000	Baixa
Produto 4	SA 3 SA 4 SA 5	Xarope	200mL	SA 3: 0,09 SA 4: 0,042 SA 5: 0,00041	SA 3: <0,1 SA 4: <0,1 SA 5: 0,1-1	9.950	2.000	Baixa
Produto 5	SA 2	Gotas Orais	15mL	0,2	0,1-1	12.903	200	Média
Produto 6	SA 6	Spray Nasal	10mL	0,05	100-1000	9.523	100	Alta
Produto 7	SA 7	Loção Capilar	100mL	0,1	<0,1	9.900	1000	Média
Produto 11	SA 7	Creme	30g	0,1	<0,1	6.644	200	Média
Produto 12	SA 7 SA 9	Creme	30g	SA 7: 0,10 SA 9: 0,32	SA 7: <0,1 SA 9: >1000	6.644	200	Média
Produto 13	SA 10	Solução Bucal	200mL	0,074	<0,1	9.950	2000	Alta